

**FACULTAD DE CIENCIAS  
GRADO EN QUÍMICA  
TRABAJO FIN DE GRADO  
CURSO ACADÉMICO [2016-2017]**

**TÍTULO:**

**ANÁLISIS DE ANTIBIÓTICOS EN CEMENTOS PARA  
PRÓTESIS POR HPLC**

**AUTOR:**

**ANTONIO JOSÉ PATRICIO TEROL**



## RESUMEN

El uso de cementos acrílicos con antibióticos es uno de los métodos más efectivos para el tratamiento y la prevención de infecciones en intervenciones quirúrgicas, porque permite la liberación de forma gradual del antibiótico empleado. En los últimos años se ha estudiado las características de la mezcla de antibiótico y cemento en diferentes experimentos y los parámetros más importantes en análisis de antibióticos en muestras de cementos. Los antibióticos empleados en este trabajo son gentamicina y vancomicina.

El objetivo de este trabajo es el desarrollo de un estudio general sobre el análisis de gentamicina y vancomicina, además del estudio de los parámetros analíticos y su aplicación en análisis de muestras reales de cemento. Se prepararon curvas de calibrado de vancomicina y se almacenaron a distintas temperaturas durante un día y una semana, para estudiar la influencia de la temperatura de almacenamiento ante una posible degradación del antibiótico, y la reproducibilidad de los resultados a distintas semanas.

Se ha empleado Palamed®G, un cemento acrílico que contiene gentamicina, y cemento Palamed®G+V, que combina gentamicina y vancomicina. Las muestras de cemento con antibiótico se sumergieron en disolución fisiológica salina 0,9%, y se incubaron a 37°C, recogiendo el extractante a intervalos de tiempo definidos, hasta 288 horas. Las muestras se analizaron mediante la técnica HPLC, empleando como fase móvil metanol-agua-tampón acetato de amonio (0,02 M) (35/60/5) (v/v/v %), en una columna C18 LiChrospher® 100 RP-18 (5µm), con detección UV.

En este trabajo se concluye que las muestras de cemento no son homogéneas, y la etapa de mezclado y el sistema a vacío no son eficientes, y, por lo tanto, la cantidad de antibiótico que contiene el cemento empleado en cirugía se desconoce. Se ha realizado un estudio de vancomicina a distintas temperaturas, que permiten concluir que no ha habido degradación de vancomicina en los primeros días de almacenamiento, ni con el paso del tiempo.

Los resultados demuestran que la liberación de vancomicina se produce antes que la liberación de gentamicina, en la primera hora, liberando una gran cantidad de antibiótico en la zona. Además, la presencia de vancomicina aumenta la liberación de gentamicina en las muestras que combinan ambos antibióticos.

**Palabras clave:** liberación de antibiótico, cemento acrílico con antibiótico, vancomicina, gentamicina, HPLC.



## ABSTRACT

The use of acrylic cements with antibiotics is one of the most effective methods for the treatment and prevention of infections in surgical interventions, because it allows for the gradual release of antibiotic used. In the last few years has studied the characteristics of the mixture of antibiotic and cement in different experiments and the most important parameters in the analysis of antibiotics in samples of cement. The antibiotics used in this work are gentamicin and vancomycin.

The objective of this work is the development of a general study on the analysis of gentamicin and vancomycin, in addition to the study of the analytical parameters and its application in analysis of real samples of cement. Calibration curves were prepared of vancomycin and stored at different temperatures during one day and one week, to study the influence of the temperature of storage before a possible degradation of the antibiotic, and reproducibility of the results to different weeks.

It has been used Palamed®G, an acrylic cement that contains gentamicin, and Palamed®G V cement, which combines gentamicin and vancomycin. The antibiotic cement samples were immersed in 0.9% saline physiological solution, and incubated at 37°C, collecting the extractant at defined time intervals, up to 288 hours. The samples were analyzed by HPLC, using as mobile phase methanol-water-ammonium acetate buffer (0.02 M) (35/60/5) (v/v/v %), in a column C18 LiChrospher® 100 RP-18 (5µm), with UV detection.

The work concludes that the samples of cement are not homogeneous, and the stage of mixing and the vacuum system are not efficient, and therefore the amount of antibiotic that contains the cement used in surgery is unknown. A vancomycin study has been made at different temperatures, it can be concluded that there has been no degradation of vancomycin in the first days of storage or with the time.

The results show that the release of vancomycin occurs before the release of gentamicin, in the first hour, releasing a large amount of antibiotic in the area. In addition, the presence of vancomycin increases the release of gentamicin in the samples that combine both antibiotics.

**Keywords:** release of antibiotic, acrylic-loaded-bone-cement, vancomycin, gentamicin, HPLC.



# ÍNDICE

1.INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Antecedentes .....	1
1.2 Antibióticos en cementos .....	1
1.3 Extractante empleado .....	6
1.4 Técnica de análisis .....	7
2. OBJETIVOS .....	10
3. EXPERIMENTAL .....	11
3.1 Reactivos .....	11
3.2 Preparación de disoluciones patrón .....	11
3.3 Mezcla de cemento y antibiótico .....	12
3.4 Etapa de mezclado.....	13
3.5 Instrumentación empleada .....	13
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	15
4.1 Rectas de calibrado de vancomicina .....	17
4.2 Rectas de calibrado de gentamicina .....	29
4.3 Cinética de liberación de antibióticos en muestras de cemento .....	33
4.3.1 Gentamicina .....	34
4.3.2 Vancomicina .....	39
4.4 Muestras de cemento.....	41
4.4.1 Gentamicina .....	42
4.4.2 Vancomicina .....	46
5. CONCLUSIÓN .....	48
6. REFERENCIAS .....	49
7. ANEXO	





## 1.INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes

El uso de antibióticos en cementos acrílicos para prótesis es uno de los métodos más aceptados para el tratamiento y la prevención de infecciones bacterianas en intervenciones quirúrgicas, ya que el antibiótico se libera directamente en la zona afectada. En 1970, se introduce el concepto de *acrylic loaded bone cement* (ALBC), incorporando antibióticos en cementos acrílicos de polimetilmetacrilato, (PMMA), para intervenciones quirúrgicas de articulaciones.<sup>1</sup>

En los últimos años, la incorporación de antibióticos con PMMA en cirugías ortopédicas ha sido muy frecuente, ya que el polimetilmetacrilato es uno de los mejores medios para la fijación de los implantes, además de que permite utilizar elevadas cantidades de antibióticos, consiguiendo altas concentraciones locales del medicamento en la zona intervenida.

### 1.2 Antibióticos en cementos

La utilización de cementos acrílicos que contienen antibióticos permite la liberación de forma gradual con el paso del tiempo, del antibiótico empleado, debido a que el medio fisiológico entra en contacto con la superficie del cemento y difunde hacia el interior de la matriz polimérica. Para que este proceso tenga lugar, es necesario una cierta porosidad y rugosidad en el cemento,<sup>2,3</sup> que dependen de la densidad del cemento empleado, del proceso de mezcla del polvo de cemento con el líquido monómero<sup>3</sup> y la velocidad de mezclado.<sup>4</sup> Por lo tanto, la elección del tipo de cemento empleado y la preparación del cemento son etapas críticas que determinan la rugosidad y la porosidad del cemento, siendo un objetivo fundamental el estudio de estas propiedades mecánicas en numerosos artículos bibliográficos.<sup>3,5-9</sup>

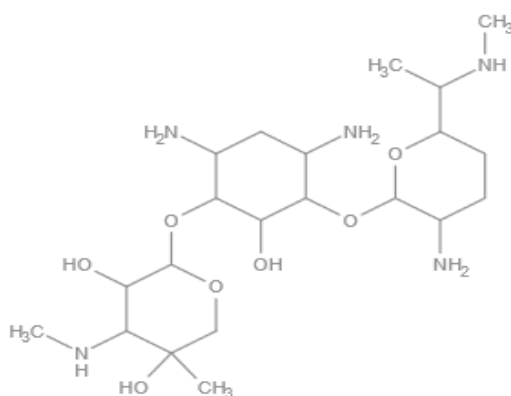
Otros factores que afectan a la liberación del antibiótico son, por ejemplo, el modo de mezcla del polvo de cemento<sup>4,10</sup> y el monómero utilizado. El PMMA empleado en cementos para prótesis está compuesto por monómeros de polimetilmetacrilato, que contiene dobles enlaces carbono-carbono que reaccionan con radicales libres producidos por un iniciador radicalario. El monómero libre reacciona con otras moléculas de monómero, dando lugar a una reacción de polimerización.

A parte del PMMA, también se emplean polietilmetacrilato, PEMA, o polibutilmetacrilato PBMA, para reducir la temperatura de la reacción exotérmica en la formación del cemento<sup>11</sup>.

La elección del antibiótico es uno de los problemas principales<sup>10</sup>, ya que debe servir un extenso espectro antibacteriano, que incluya bacterias Gram positivas y Gram negativas, además de un bajo porcentaje de especies que sean resistentes al antibiótico. Los antibióticos más empleados en intervenciones quirúrgicas mezclados con cementos son gentamicina, tobramicina y vancomicina entre otros, como por ejemplo cefazolina o clindamicina.

Uno de los antibióticos empleados en este trabajo es gentamicina, ya que es uno de los antibióticos de mayor interés, con un amplio espectro antibacteriano, además que es activo contra las bacterias Gram positivas y Gram negativas. En la figura 1 se muestra la estructura molecular de gentamicina.

**Figura 1.** Estructura molecular de gentamicina.

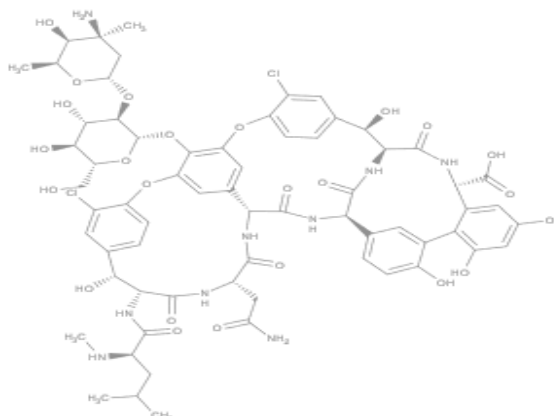


El sulfato de gentamicina que se comercializa es un amino glucósido muy empleado en cementos acrílicos para prevenir infecciones, debido a su alta eficacia antibacteriana, su especificidad, alta estabilidad química y térmica y alta solubilidad en agua, además una actividad bacteriana más duradera contra bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia Coli*.

En este proyecto también se ha empleado vancomicina, ya que es otro de los antibióticos más empleados en cirugía ortopédica, debido a su facilidad de obtención y a su alta actividad bacteriana contra bacterias como *Enterococcus* o *Streptococcus*.<sup>12</sup>

La estructura molecular de vancomicina se muestra en la figura 2.

**Figura 2.** Estructura molecular de vancomicina.



En los últimos años se han estudiado las características de la mezcla antibiótico y cemento mediante diferentes ensayos experimentales y también los parámetros analíticos de mayor interés en el análisis de antibióticos en cementos.

Por lo tanto, es necesario realizar una revisión de la documentación bibliográfica sobre el análisis de antibióticos en cementos, que características se han optimizado, que condiciones experimentales se han llevado a cabo y que resultados se han obtenido. La tabla 1 recoge la información más destacada de los artículos científicos revisados en los que se realizaron análisis de gentamicina y/o vancomicina en muestras reales de cemento.

**Tabla 1.** Características de las muestras de cemento empleadas en la bibliografía.

Artículo	Tamaño de muestra	Tipo de cemento	Características del cemento
<i>Evaluation of elution and mechanical properties of high-dose antibiotic loaded bone cement...</i> <sup>7</sup>	Cilindro de 12 mm alto 6 mm diámetro	Cemento Palacos ® Vancomicina Cefazolina	Cemento alta viscosidad Cemento baja viscosidad
<i>Antibiotic-loaded acrylic bone cements: An in vitro study on the release mechanism...</i> <sup>3</sup>	Molde aluminio 90 × 90 × 24 mm 12 mm diámetro	Cemento Palacos ® Gentamicina Cemento Palacos ® Vancomicina	Cemento alta viscosidad Cemento baja viscosidad
<i>In Vitro Elution Studies of Amikacin and Cefazolin from...</i> <sup>13</sup>	Esfera de 6mm diámetro	Mezclado manual sulfato gentamicina y PMMA	-
<i>Elution characteristics of vancomycin and tobramycin in acrylic bone cement</i> <sup>14</sup>	Cilindro de 20 mm ancho 28 mm diámetro	Cemento Palacos® Vancomicina Tobramicina	Cemento alta viscosidad

En la tabla se muestra el título de los artículos científicos, así como el tamaño y la forma de las muestras para el análisis de antibióticos y una descripción de las propiedades del cemento empleado en cada uno de los proyectos, en referencia a la viscosidad.

Para que esas muestras sean reproducibles deben tener las mismas dimensiones y para ello se suelen preparar distintos moldes cilíndricos de diferentes materiales para rellenarlos con las muestras de cemento y antibiótico. En algunos artículos optan por moldes cilíndricos de dimensiones conocidas, tanto moldes prediseñados de silicona como moldes de aluminio. Las características de estos moldes deben ser las adecuadas para evitar una posible contaminación y degradación de la muestra, o un desgaste en la superficie del cemento. Aparte del material de los moldes de cemento, también es importante tener en cuenta las dimensiones, como por ejemplo el diámetro o el grosor de los cilindros, ya que deben ser las adecuadas para permitir la liberación del antibiótico en la muestra de cemento gracias a la difusión del líquido extractante hacia el interior de la matriz polimérica.

Como se ha indicado en la tabla, también se muestra el tipo de cemento empleado en cada ensayo de análisis. En los experimentos se pueden emplear cementos de alta o baja viscosidad, propiedad que va a determinar otras propiedades mecánicas de las muestras de cemento, como la rugosidad de la superficie de la muestra o la porosidad de la matriz polimérica. Estas propiedades mecánicas también son de gran interés, por lo que en multitud de artículos científicos se estudian estas propiedades en los diferentes tipos de mezclas de cementos con antibióticos, sometiendo este tipo de muestras a ensayos mecánicos de tracción etc., analizando posteriormente posibles degradaciones de las muestras, o pérdida de las propiedades mecánicas del cemento<sup>3,5,7-9</sup>

Otra de las características a optimizar que se pone de manifiesto en la bibliografía consultada es el método de preparación del cemento, o etapa de mezclado del cemento con el antibiótico en polvo. En la tabla 2 se resume los métodos de mezclado realizados en diferentes estudios de análisis cinético de liberación de antibiótico en muestras de cemento.

**Tabla 2.** Combinación de dos o más antibióticos en muestras de cemento acrílico.**TABLE II.** Combination of Two or More Antibiotics for Enhancement of Antibiotic Elution from Acrylic Bone Cement

Study	Cement Used	Medium Used	Cement Preparation Method	Test Environment	Antibiotic Combination <sup>a</sup>	Effect
Anagnostakos et al. <sup>28</sup>	Palacos	Hip spacers	Manually mixed	Tryptone soya broth	0.5 Gentamicin + 2 g Vancomycin 0.5 g Gentamicin + 0.2 g Teicoplanin	[Gentamicin] ↑
Anagnostakos et al. <sup>13,29</sup>	Palacos	Hip spacers	Manually mixed	Tryptone soya broth	0.5 g Gentamicin + 1.2 g Linezolid	[Linezolid] ↑
Bertazzoni Minelli et al. <sup>33</sup>	Cemex	Cylinders	Manually mixed	Phosphate-buffered saline	Gentamicin + Vancomycin	[Vancomycin] ↓ [Gentamicin] ↑
Cerretani et al. <sup>18</sup>	CMW 1 Palacos Simplex	Disks	Manually mixed	Normal saline	2 g Vancomycin + 2 g Imipenem-cilastatin	[Vancomycin] ↑
Klekamp et al. <sup>30</sup>	Palacos Simplex	Cylinders	Manually mixed and vacuum	Phosphate-buffered saline	1/2/3 g Vancomycin + 1.2/2.4 g Tobramycin	[Tobramycin] ↓
Kuechle et al. <sup>8</sup>	Palacos Simplex	Disks	Vacuum mixing chamber	Phosphate-buffered saline	Amikacin + Vancomycin	[Amikacin] ↑ + [Vancomycin] ↑
Masri et al. <sup>27</sup>	Palacos	Hip spacers	Not reported	Hip joint fluid	1–2 g Vancomycin + 1.2–4.8 g Tobramycin	[Vancomycin] ↑
McLaren et al. <sup>34</sup>	Palacos	Beads	Manually mixed	Phosphate-buffered saline	4 g Vancomycin + 3.6 Tobramycin + 6 Cephalosporin	[Tobramycin] ↑
Neut et al. <sup>19</sup>	SmartSet	Disks	Manually mixed	Tryptone soya broth	0.5/1 Gentamicin + 0.5/1 g Clindamycin	[Gentamicin] ↑ (the effect was dependent on gentamicin dose used)
Penner et al. <sup>26</sup>	Palacos	Disks	Manually mixed	Normal saline	0.5/1 Gentamicin + 0.5/1 g fusidic acid 1 g Vancomycin + 2.4 g Tobramycin	[Tobramycin] ↑ by 68% + [Vancomycin] ↑ by 103%
Simpson et al. <sup>17</sup>	Palacos SmartSet	Disks	Optivac system	Phosphate-buffered saline	1 g Gentamicin + 1 g Vancomycin	[Gentamicin] ↑ + [Vancomycin] ↑

<sup>a</sup>All doses per 40 g PMMA.Fuente:<sup>15</sup>

Tal como se observa en la tabla 2, la etapa de mezclado del cemento se realiza tanto de forma manual como mediante un sistema de mezclado a vacío. Este sistema de mezclado consta de un compartimento para el mezclado del cemento en polvo y el antibiótico sólido con el monómero de PMMA líquido. La mezcla de estos componentes debe ser lo más homogénea posible, y para ello este sistema dispone de un émbolo que permita realizar la mezcla lo mejor posible además de una conducción a vacío para eliminar las inclusiones de aire que se generan en el mezclado.

En la mayoría de los artículos la etapa de mezclado se realiza de forma manual, con una agitación constante de la mezcla mediante el uso de una espátula. Algunos artículos muestran que la liberación del antibiótico en muestras preparadas con mezclado manual es menos efectiva que en muestras preparadas con el sistema de vacío, debido a una mayor homogeneización de la mezcla y una estructura más ordenada de la matriz polimérica<sup>3,16–18</sup>. También es necesario controlar las condiciones de humedad y temperatura del laboratorio donde se realizan los ensayos, ya que influyen en el tiempo de fraguado de las muestras. El tiempo de fraguado de las muestras también depende del tipo de cemento, en concreto de su densidad.

En la tabla también se muestra la combinación de dos antibióticos en una muestra de cemento, como por ejemplo gentamicina y vancomicina, en diferentes concentraciones.

En estos artículos se demuestra que combinando dos o más antibióticos se potencia o disminuye el efecto antibiótico de los antibióticos empleados.<sup>5,15,19</sup>

### 1.3 Extractante empleado

Una vez realizado un primer estudio de optimización del tipo de cemento empleado, las dimensiones de las muestras y la etapa de mezclado de los componentes, es necesario comparar los distintos tipos de líquidos extractantes que permitan una liberación del antibiótico lo más efectiva posible. En la tabla 3 se resumen los extractantes más empleados en los estudios recientes de análisis de gentamicina y vancomicina.

**Tabla 3.** Extractantes y condiciones de extracción empleados en estudios recientes.

Artículo	Condiciones de mezclado	Tamaño de muestra	Extractante	Condiciones de extracción
<i>The in vitro elution characteristics of Vancomycin Combined...</i> <sup>20</sup>	Condiciones estériles de mezclado	Cilindro de 20 mm altura 22 mm diámetro	Disolución fisiológica salina. (0.9 % NaCl)	40 mL disolución salina T <sup>a</sup> amb. Tomar 5 mL mantener -20 °C
<i>Evaluation of elution and mechanical properties...</i> <sup>7</sup>	Temperatura amb. (20 °C ± 2 °C) Humedad (35 % ± 5%)	Cilindro de 12 mm altura 6 mm diámetro	Tampón fosfato salino (PBS, Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA)	5 mL PBS cada muestra 37 °C, sin agitación
<i>Antibiotic Loaded acrylic bone cements: An in vitro study on the release...</i> <sup>3</sup>	-	Cilindro de 10 mm diámetro	<i>Simulated body fluid</i> (SBF)	30 mL SBF 37 °C, sin agitación. Tomar 2 mL

El *simulated body fluid* (SBF) es uno de los extractantes más empleados en este tipo de proyectos debido a su similitud en la composición química con el plasma sanguíneo del cuerpo y a su gran capacidad de difusión y de liberación del antibiótico. Las muestras de cemento con antibiótico se sumergen en este extractante para extraer el antibiótico de la muestra.<sup>21</sup> En la tabla 4 se compara la composición química del SBF con la del plasma sanguíneo.

**Tabla 4.** Comparación de la composición del SBF con la del plasma sanguíneo.

Nominal ion concentrations of SBF in comparison with those in human blood plasma

Ion	Ion concentrations (mm)	
	Blood plasma	SBF
Na <sup>+</sup>	142.0	142.0
K <sup>+</sup>	5.0	5.0
Mg <sup>2+</sup>	1.5	1.5
Ca <sup>2+</sup>	2.5	2.5
Cl <sup>-</sup>	103.0	147.8
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	27.0	4.2
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1.0	1.0
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0.5	0.5
pH	7.2–7.4	7.40

Fuente:<sup>21</sup>

El tampón fosfato salino (PBS) también es un extractante empleado que se utiliza comercializado o preparado en el laboratorio. Otro de los extractantes más empleados es una disolución fisiológica salina de NaCl al 0,9 %.

La elección de la técnica analítica para el análisis de antibióticos en cementos es otra etapa a tener en cuenta en consideración para el análisis de antibióticos en cementos.

#### 1.4 Técnica de análisis

- **Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

La cromatografía líquida en columna es una variedad de la cromatografía en la que se emplea una fase móvil líquida, que pasa a través de la fase estacionaria, líquida o sólida, retenida en una columna cromatográfica. Esta técnica se desarrolla en equipos denominados cromatógrafos de líquidos, instrumentos compuestos por elementos básicos, como el sistema de inyección de muestras, la columna cromatográfica, o el detector.

La columna cromatográfica es un elemento esencial del cromatógrafo de líquidos ya que en ella tiene lugar la separación de los analitos y los interferentes, a través de diferentes mecanismos, como adsorción, cambio iónico, exclusión y reparto.

El sistema de detección es otro elemento básico de un cromatógrafo líquido, situado a la salida de la columna cromatográfica, que registra información de forma continua sobre el flujo que circula a través de él, generando una señal eléctrica, que amplificada constituye un cromatograma.

La tabla 5 recoge las condiciones experimentales y los elementos empleados para el análisis de vancomicina mediante la técnica HPLC.

**Tabla 5.** Condiciones experimentales y elementos empleados en HPLC para vancomicina.

Artículo	Fase móvil empleada	Columna empleada	Condiciones de análisis
<i>Development and validation of an HPLC method for vancomycin and its application...</i> <sup>22</sup>	50Mm de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ a pH 4 y acetonitrilo (92/8 v/v %)	Columna C18 Nucleosil 120 $5\mu\text{m}$ (150 mm $\times$ 4.0 mm)	Detector UV 220 nm Velocidad de flujo 1 mL/min
<i>Determination of free vancomycin, ceftriaxone, cefazolin and ertapenem in plasma by ultrafiltration...</i> <sup>23</sup>	50 mM $\text{Na}_3\text{PO}_4$ a pH 2.4 y acetonitrilo (100/8 v/v %)	Columna Waters x Bridge C18 BEH 2.5 $\mu\text{m}$ (50 mm $\times$ 3 mm)	Detector UV 240 nm Velocidad de flujo 1 mL/min
<i>Simultaneous determination of vancomycin and ceftazidime in cerebrospinal fluid in craniotomy patients...</i> <sup>24</sup>	Tampón acetato amonio a pH 3.5 y acetonitrilo (8/92 v/v %)	Columna C18 Diamonsil $5\mu\text{m}$ (200 mm $\times$ 4.6 mm)	Detector UV 240 nm Velocidad de flujo 1 mL/min
<i>Determination of vancomycin in human plasma using high-performance liquid chromatography...</i> <sup>25</sup>	5 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ a pH 6.3 con 5 mM HCl y metanol	Columna C18 Waters Associates Bondapak (300 mm $\times$ 4 mm)	Detector de fluorescencia 252 nm Velocidad de flujo 1 mL/min

La tabla 6 resume las condiciones experimentales y los elementos empleados para el análisis de gentamicina mediante la técnica HPLC.



**Tabla 6.** Condiciones experimentales y elementos empleados en HPLC para gentamicina.

Artículo	Fase móvil empleada	Columna empleada	Condiciones de análisis
<i>Determination of Gentamicin Released from Orthopedic<sup>26</sup></i>	Metanol-agua-tampón acetato de amonio (0.02 M) (35/60/5) (v/v/v %)	Columna Zorbax Rx-C-18	Detector UV 280 nm Velocidad de flujo 0.3 mL/min
<i>Antibiotic-loaded acrylic bone cements: An in vitro study on the release mechanism<sup>3</sup></i>	Acetonitrilo, tris (hidroximetil) amino metano (Tris) 1-fluoro 2,4 dinitrobenzeno	Lichrocart 250 x 404 mm Licrosphere 100 RP-18	Detector UV 365 nm Velocidad de flujo 1.3 mL/min

Las tablas 5 y 6 resumen las principales condiciones experimentales de análisis de vancomicina y gentamicina, mediante la técnica HPLC, como son la fase móvil, la columna cromatográfica y otras condiciones, como la velocidad de flujo o la longitud de onda del detector UV-Vis. La fase móvil que se emplea está formada por una disolución tampón para mantener el pH y por un disolvente orgánico, como, por ejemplo, acetonitrilo o metanol.

En cuanto a la columna cromatográfica, la mayoría de los proyectos emplean columnas C18, de distintas firmas comerciales. El detector que se emplea en la mayoría de los estudios es un detector UV, siendo la longitud de onda una variable importante en la detección de los antibióticos. Para la detección de gentamicina, el rango de longitud de onda empleado es 280-365 nm, mientras que el rango de análisis para vancomicina es 198-380 nm.

- **Inmunoensayo de polarización fluorescente (FPIA)**

En numerosos artículos se emplea técnica de FPIA como alternativa a la técnica HPLC para el análisis de gentamicina y vancomicina.<sup>2,27-29</sup>

## 2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es realizar un estudio sobre el análisis de los antibióticos empleados en cirugías prostéticas, como gentamicina y vancomicina, estableciendo las características analíticas como son: los límites de cuantificación y detección, así como la linealidad de las rectas de calibrado, la reproducibilidad de los análisis, y su aplicación en muestras reales de cemento con antibiótico.

Una vez realizada la revisión bibliográfica de los artículos de mayor interés en los últimos años relacionados con el análisis de antibióticos en cementos, para conocer los antibióticos más empleados en cirugía prostética, y una vez visto cuáles son los de mayor interés, se han elegido los antibióticos gentamicina y vancomicina.

Una vez estudiadas las condiciones experimentales del análisis de estos dos antibióticos, se ha optado por utilizar la técnica HPLC, optimizando la fase móvil empleada, la columna cromatografía, el volumen de inyección, la velocidad de flujo y la longitud de onda de detección. Para la optimización de estas condiciones analíticas, se han realizaron distintos ensayos con disoluciones patrón de los antibióticos variando la fase móvil y la longitud de onda, comparando los resultados obtenidos. Una vez optimizadas estas condiciones de análisis, se preparan disoluciones de distinta concentración de patrón de gentamicina y vancomicina a partir de un patrón comercial, para la obtención de las rectas de calibrado de cada uno de los antibióticos.

Finalmente, una vez obtenidas las rectas de calibrado, se realiza un estudio quimiométrico de los parámetros analíticos de mayor interés, para posteriormente realizar un ensayo experimental de análisis en muestras reales de cemento en base a estos resultados.

### 3. EXPERIMENTAL

#### 3.1 Reactivos

Para la preparación de las disoluciones patrón de gentamicina se ha empleado disolución fisiológica salina de NaCl al 0,9 %, ya que el patrón inicial del que se disponía era una disolución de gentamicina 80 mg/mL en disolución fisiológica salina. En cambio, para preparar las disoluciones patrón de vancomicina se ha empleado agua desionizada ultra pura, porque se disponía de vancomicina en polvo y varias ampollas de agua desionizada para su disolución.

#### 3.2 Preparación de disoluciones patrón

##### Disoluciones patrón de vancomicina

Se han realizado un total de seis rectas de calibrado de vancomicina, de las cuales tres se han almacenado a 4°C durante un día y las otras tres se han almacenado a 37 °C durante un día, para estudiar la influencia de la temperatura de almacenamiento ante una posible degradación del antibiótico. También se ha analizado una recta de calibrado de vancomicina que se ha almacenado durante una semana a 4°C y a 37°C, para su posterior análisis, y para estudiar la reproducibilidad de los resultados. Por último, se ha preparado una recta de calibrado a concentraciones muy bajas, para determinar los límites de detección y cuantificación del método.

Para la preparación de la recta de vancomicina se prepara una disolución madre de 500 mg/L de vancomicina. Para ello, en primer lugar, se pesa 0,500 g de vancomicina en polvo en una balanza analítica y se disuelven en 10 mL de agua desionizada ultra pura en un matraz aforado de 10 mL, para después tomar 1 mL de esta disolución con pipeta aforada y llevarlo a un matraz aforado de 100 mL enrasando con agua ultra pura hasta el enrase, obteniendo la disolución madre de 500 mg/L.

A partir de esta disolución madre se preparan los patrones de vancomicina para la recta de calibrado, con concentraciones entre 5 – 100 mg/L, enrasando cada uno de ellos con agua desionizada ultra pura y utilizando pipetas y matraces aforados.

Esta recta de calibrado se realizó por cuadruplicado y se almacenó a 4°C y a 37 °C durante un día y durante una semana. A partir del patrón de 10 mg/L se prepara la recta de calibrado para estudiar los límites de cuantificación y detección del método, preparando patrones con concentraciones muy bajas de vancomicina, entre 0,1 – 2 mg/L.

Esta recta de calibrado se realizó por duplicado y se almacenó a 4°C y a 37 °C durante un día, para su análisis.

### Disoluciones patrón de gentamicina

Se ha realizado una recta de calibrado de gentamicina, almacenada a 4°C por precaución, y medida a longitudes de onda diferentes en el detector, una recta se midió a 254,4 nm y la otra a 280,4 nm.

La preparación de la recta de calibrado de gentamicina se realizó por pesada, y diluyendo el antibiótico en disolución fisiológica salina de NaCl al 0,9 %, obteniendo las siguientes concentraciones, entre 1 – 100 mg/L.

**Tabla 7.** Concentración de disoluciones patrón de gentamicina.

Patrón	Concentración / mg/L
1	1,0866
2	5,2840
3	10,9400
4	27,9679
5	52,6507
6	82,4886
7	103,537

### 3.3 Mezcla de cemento y antibiótico

En este proyecto se han empleado dos tipos distintos de cementos, cemento Palamed®G (Heraeus Medical GmbH, Germany), que es un cemento de fraguado rápido y viscosidad media compuesto de PMMA y que contiene el antibiótico aminoglucósido gentamicina, 0,55 g de gentamicina en 44,9 g de cemento en polvo, y cemento Palamed®G+V (Heraeus Medical GmbH, Germany) un cemento de fraguado lento compuesto de PMMA, que contiene 0,50 g de gentamicina y 2,0 g de vancomicina en 44,9 g de cemento en polvo.

El polímero en polvo del cemento Palamed®G está compuesto por gentamicina (en forma de sulfato de gentamicina), poli (acrilato de metilo, metacrilato de metilo), dióxido de circonio (como medio de contraste radiológico), peróxido de benzoilo y clorofila (E141) para mejorar su visibilidad en el campo quirúrgico.

El polímero en polvo del cemento Palamed®G+V está compuesto por gentamicina y vancomicina, poli (acrilato de metilo, metacrilato de metilo), dióxido de circonio, peróxido de benzoilo y clorofila (E141).

El monómero líquido de PMMA empleado está compuesto por metacrilato de metilo, N, N-dimetil-p-toluidina, hidroquinona y clorofila (E141).

### 3.4 Etapa de mezclado

El cemento óseo se prepara mezclando un polímero en polvo y un monómero líquido. Éstos forman una masa dúctil que se endurece al cabo de unos minutos, dependiendo de la densidad y viscosidad del cemento empleado. La mezcla de los componentes se puede realizar con un equipo de mezcla al vacío o manualmente, como se ha revisado en la bibliografía.

En este trabajo se ha empleado un sistema comercial a vacío como el que se observa en la figura 1, para la mezcla del polímero en polvo y el monómero líquido, y así obtener un cemento óseo con una cantidad reducida de inclusiones de aire. Este sistema es un equipo de mezcla hermético que garantiza un vacío suficiente en el recipiente de mezclado.

**Figura 3.** Sistema de mezclado a vacío empleado.



Una vez que se ha realizado la mezcla, se agita de forma manual durante aproximadamente 30 segundos, y se preparan las distintas muestras de cemento para su análisis.

### 3.5 Instrumentación empleada

En la bibliografía anteriormente comentada, se citan estudios de análisis de antibióticos mediante inmunoensayo de polarización fluorescente. También se citan estudios de análisis de gentamicina y vancomicina mediante HPLC empleando distintas condiciones experimentales. Por lo tanto, se ha elegido la técnica HPLC porque permite el análisis de los dos antibióticos de manera simultánea, en una misma inyección de muestra, optimizando las condiciones experimentales.

El análisis de las rectas de calibrado y las muestras de cemento de vancomicina y gentamicina se realizaron utilizando un cromatógrafo líquido de alta resolución, modelo

Agilent Technologies, serie 1260 Infinity, que se muestra en la figura 4. El detector empleado es Agilent Technologies DAD, 1290 Infinity.

**Figura 4.** Cromatógrafo líquido de alta resolución, Agilent Technologies empleado.



En la tabla 8 se resumen las condiciones experimentales de trabajo empleadas en este trabajo para las rectas de calibrado de gentamicina y vancomicina, y para las muestras reales de cemento:

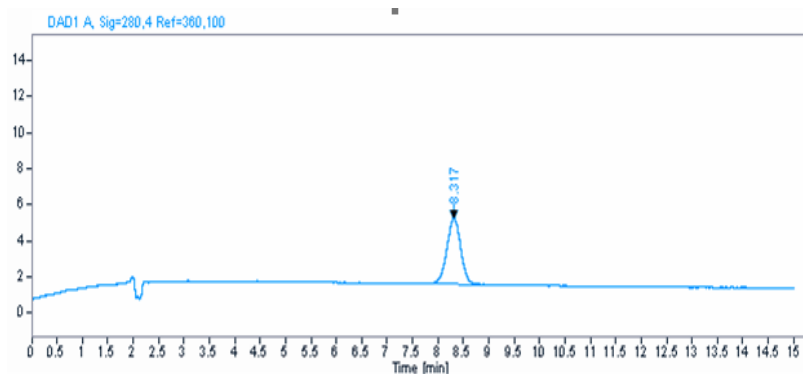
**Tabla 8.** Condiciones experimentales para análisis de gentamicina y vancomicina.

Fase móvil empleada	Metanol-agua- tampón acetato de amonio (0,02 M) (35/60/5) (v/v/v %)
Volumen de inyección	20 $\mu$ L
Columna cromatográfica	C18 LiChrospher® 100 RP-18 (5 $\mu$ m), Agilent Technologies
Detector	Diode Array Detector (DAD)
Longitud de onda de detección	254,4 y 280,4 nm gentamicina 280,4 nm vancomicina

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos son una serie de cromatogramas, como el que se muestra en la figura 5.

**Figura 5.** Cromatograma de patrón de gentamicina.



De cada una de las disoluciones patrón se obtiene el cromatograma correspondiente y el área cromatográfica. Estas áreas se representan gráficamente frente a la concentración de antibiótico, ya que existe una relación lineal entre las áreas cromatográficas ( $y$ ), y la concentración ( $x$ ) de cada patrón, obteniendo la recta de regresión correspondiente. La recta de calibrado obtenida toma la forma algebraica:

$$y = a + bx$$

siendo  $b$  la pendiente de la recta y  $a$  su ordenada en el origen. Se emplea el método de los mínimos cuadrados para obtener la pendiente, ( $b$ ) y la ordenada en el origen, ( $a$ ) de la recta de regresión.

El cálculo de la pendiente se realiza empleando la Ecuación 1<sup>30</sup>:

$$b = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \text{ (Ecuación 1)}$$

donde  $x_i$  son las concentraciones de cada disolución patrón,  $\bar{x}$  es la media de los valores de  $x$ ,  $y_i$  son las áreas cromatográficas de cada patrón,  $\bar{y}$  es la media de los valores de  $y$ .

La ordenada en el origen se calcula empleando la Ecuación 2<sup>30</sup>:

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \text{ (Ecuación 2)}$$

donde  $\bar{y}$  es la media de los valores de  $y$ ,  $\bar{x}$  es la media de los valores de  $x$ .

Además del cálculo de la pendiente y de la ordenada en el origen de la recta de calibrado, también se puede calcular la desviación aleatoria en los valores de y,  $S_{y/x}$ , un valor que estima los errores aleatorios en la dirección y, aplicando la Ecuación 3<sup>30</sup>:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \text{ (Ecuación 3)}$$

donde  $y_i$  son las áreas cromatográficas de cada patrón,  $\hat{y}_i$  son los puntos sobre la recta de regresión calculada correspondientes a los valores de concentración, y n es el número de patrones.

Una vez calculado el valor de  $S_{y/x}$  también se calcula las desviaciones estándar de la pendiente  $S_b$ , y de la ordenada en el origen  $S_a$ , mediante las Ecuaciones 4 y 5, respectivamente<sup>30</sup>:

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \text{ (Ecuación 4)}$$

donde  $S_{y/x}$  es la desviación aleatoria en los valores de y,  $x_i$  son las concentraciones de cada disolución patrón,  $\bar{x}$  es la media de los valores de x.

$$S_a = S_{y/x} \cdot \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \cdot \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \text{ (Ecuación 5)}$$

donde  $S_{y/x}$  es la desviación aleatoria en los valores de y,  $x_i^2$  es el cuadrado de las concentraciones de cada disolución patrón,  $x_i$  son las concentraciones de cada disolución patrón,  $\bar{x}$  es la media de los valores de x, y n es el número de patrones preparados.

El intervalo de confianza de la pendiente se calcula mediante la ecuación 6<sup>30</sup>:

$$b \pm (t_{(n-2,p)} \cdot S_b) \text{ (Ecuación 6)}$$

donde b es la pendiente,  $S_b$  es la desviación estándar de la pendiente y  $t_{(n-2,p)}$  un valor tabulado que depende del número de grados de libertad, para el intervalo de confianza correspondiente. Se aplica la misma ecuación para el cálculo del intervalo de confianza de la ordenada en el origen, empleando a y  $S_a$ .



#### 4.1 Rectas de calibrado de vancomicina

En este trabajo se ha elegido el antibiótico vancomicina para estudiar otros parámetros analíticos de relevancia en las rectas de calibrado, como el límite de detección y de cuantificación del método, los cuales se definen a continuación.

**Límite de detección (LOD):** se define como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento significativamente diferente de la señal del blanco o ruido de fondo.<sup>30</sup> El límite de detección se obtiene aplicando la Ecuación 7:

$$LOD = y_B + 3s_{blanco} \text{ (Ecuación 7}^{30}\text{)}$$

donde  $y_B$  es la señal del blanco, y  $s_{blanco}$  es la desviación estándar del blanco.

En este trabajo se aplica la Ecuación 8 para el cálculo del LOD:

$$LOD = a + 3s_{y/x} \text{ (Ecuación 8}^{30}\text{)}$$

ya que  $y_B = a$ , donde  $a$  es la ordenada en el origen de la recta de calibrado, y  $s_{blanco} = s_{y/x}$  donde  $s_{y/x}$  es la desviación aleatoria en los valores de  $y$ .

**Límite de cuantificación (LOQ):** es el valor de la concentración del analito más baja, para la cual es factible realizar medidas de la señal analítica suficientemente precisas.<sup>31</sup> El límite de cuantificación se obtiene aplicando la ecuación 9:

$$LOQ = y_B + 10 s_{blanco} \text{ (Ecuación 9}^{30}\text{)}$$

donde  $y_B$  es la señal del blanco, y  $s_{blanco}$  es la desviación estándar del blanco.

Se prepararon un total de seis rectas de calibrado con antibiótico vancomicina, almacenadas a distintas temperaturas, y analizadas en distintas semanas.

##### **Recta de calibrado 1. (Almacenamiento a 4°C un día)**

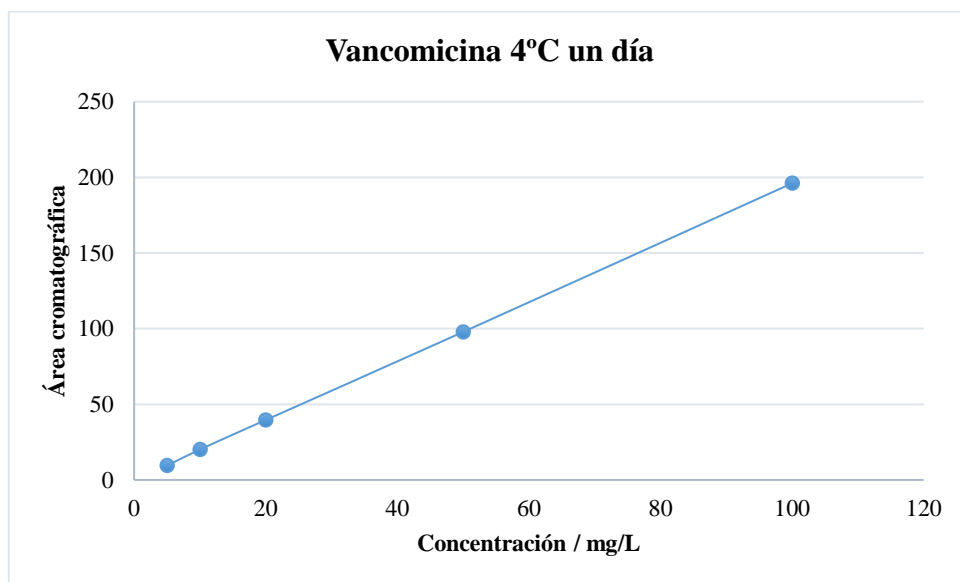
A continuación, en la tabla 9 se muestran las áreas de los patrones de vancomicina almacenados a 4°C durante un día, en cada uno de los cromatogramas obtenidos.

**Tabla 9.** Valores de áreas cromatográficas y concentración de patrones.

Patrones / mg/L	Área cromatográfica
5	9,4162
10	20,1014
20	39,6452
50	97,7999
100	196,0686

Una vez se obtienen las áreas de cada uno de los patrones, se representa gráficamente el área de cada patrón frente a su concentración, obteniendo la recta de calibrado, correspondiente a la gráfica 1, con un coeficiente de correlación lineal de  $R^2$ : 0,9999.

**Grafica 1.** Recta de calibrado de vancomicina almacenada a 4°C durante un día.



En el anexo se muestran las tablas con los cálculos para obtener los parámetros analíticos más destacados, y empleando las Ecuaciones 1 y 2, se calcula la pendiente,  $b$ , y la ordenada en el origen,  $a$ , respectivamente, de la recta de calibrado:

$$b = 1,959$$

$$a = 0,1$$

La ecuación para la recta de regresión es  $y = 1,959x + 0,1$

Con los datos recogidos en las tablas del anexo, y utilizando las ecuaciones correspondientes se calculan los parámetros analíticos recogidos en la tabla 10.

**Tabla 10.** Valores de los parámetros analíticos obtenidos de la recta de calibrado 1.

Parámetro analítico	Valor / Unidades
$S_{y/x}$	0,4
$S_B$	0,006
$S_a$	0,3
LOD	1,5 mg/L
LOQ	4,6 mg/L

El intervalo de confianza al 95 % de la pendiente y de la ordenada en el origen, de la recta de calibrado 1 se calcula aplicando la ecuación 6:

$$b = 1,959 \pm 0,018$$

$$a = 0,1 \pm 0,9$$

donde  $t(3;0,05 p) = 3,18$ .

Para el cálculo del intervalo de confianza del LOD y del LOQ, se utiliza la misma expresión, empleando  $S_{y/x}$ :

$$\text{LOD} = 1,5 \pm 1,4$$

$$\text{LOQ} = 4,6 \pm 1,4$$

donde  $t(3;0,05 p) = 3,18$ .

#### **Recta de calibrado 2. (Almacenamiento a 37°C un día)**

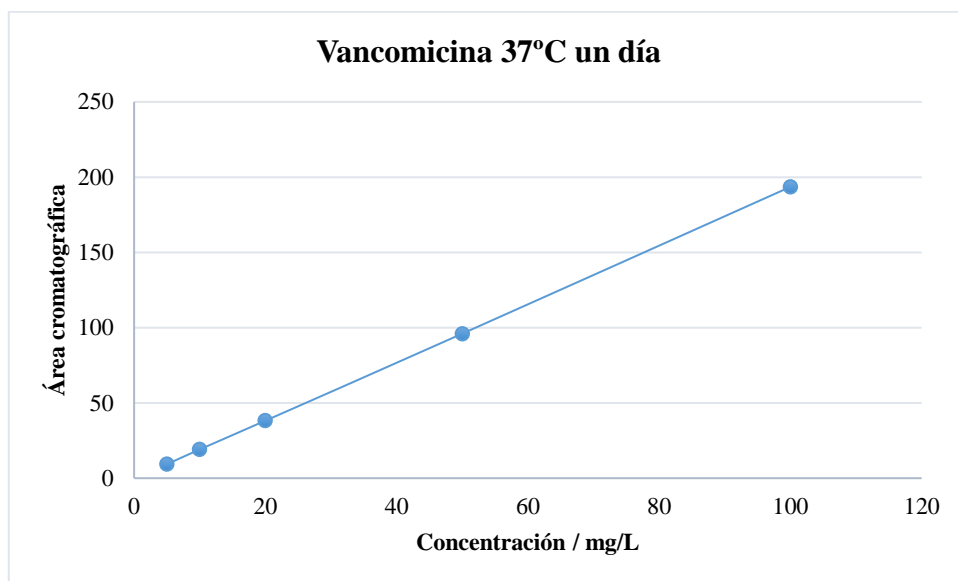
A continuación, en la tabla 11 se muestran las áreas de los patrones de vancomicina almacenados a 37°C durante un día, en cada uno de los cromatogramas obtenidos.

**Tabla 11.** Valores de áreas cromatográficas y concentración de patrones.

Patrón / mg/L	Área cromatográfica
5	9,2481
10	19,1187
20	38,1990
50	96,0279
100	193,5761

Una vez se obtienen las áreas de cada uno de los patrones, se representa gráficamente el área cromatográfica de cada patrón frente a su concentración, obteniendo la recta de calibrado, correspondiente a la gráfica 2, con un coeficiente de correlación lineal de  $R^2$ : 0,9999.

**Grafica 2.** Recta de calibrado de vancomicina almacenada a 37°C un día.



En el anexo se muestran las tablas con los cálculos para obtener los parámetros analíticos más destacados, y empleando las Ecuaciones 1 y 2, se calcula la pendiente,  $b$ , y la ordenada en el origen,  $a$ , respectivamente, de la recta de calibrado:

$$b = 1,939$$

$$a = - 0,5$$

La ecuación para la recta de regresión es  $y = 1,939x - 0,5$

Mediante los datos recogidos en las tablas del anexo, y utilizando las ecuaciones correspondientes se calculan los parámetros analíticos recogidos en la tabla 12.

**Tabla 12.** Valores de los parámetros analíticos obtenidos de la recta de calibrado 2.

Parámetro analítico	Valor/ Unidades
$S_{y/x}$	0,3
$S_B$	0,004
$S_a$	0,2
LOD	0,40 mg/L
LOQ	2,5 mg/L

El intervalo de confianza al 95 % de la pendiente y de la ordenada en el origen, de la recta de calibrado 2 se calcula aplicando la ecuación 6:

$$b = 1,939 \pm 0,012$$

$$a = - 0,5 \pm 0,6$$

donde  $t(3;0,05 p) = 3,18$ .

Intervalo de confianza del LOD y del LOQ:

$$\text{LOD} = 0,40 \pm 1,0$$

$$\text{LOQ} = 2,5 \pm 1,0$$

donde  $t(3;0,05 p) = 3,18$ .

Los intervalos de confianza de la pendiente y de la ordenada en el origen obtenidos para la recta de calibrado de vancomicina almacenada a 37°C durante un día no son significativamente diferentes, para un intervalo de confianza del 95 %, a los de la recta de calibrado de vancomicina almacenada durante un día a 4°C. Por lo tanto, la temperatura de almacenamiento no es un factor a tener en cuenta en los primeros días de preparación de las disoluciones patrón de vancomicina, ya que los resultados obtenidos demuestran que no ha habido degradación de vancomicina. Los límites de detección y cuantificación de la recta de vancomicina a 37°C son inferiores a los límites de la recta de vancomicina a 4°C. Por ese motivo, se emplea la recta de calibrado de vancomicina a 37°C en el tratamiento de resultados de muestras reales de cemento con vancomicina.

### **Recta de calibrado 3. (Almacenamiento a 4°C una semana)**

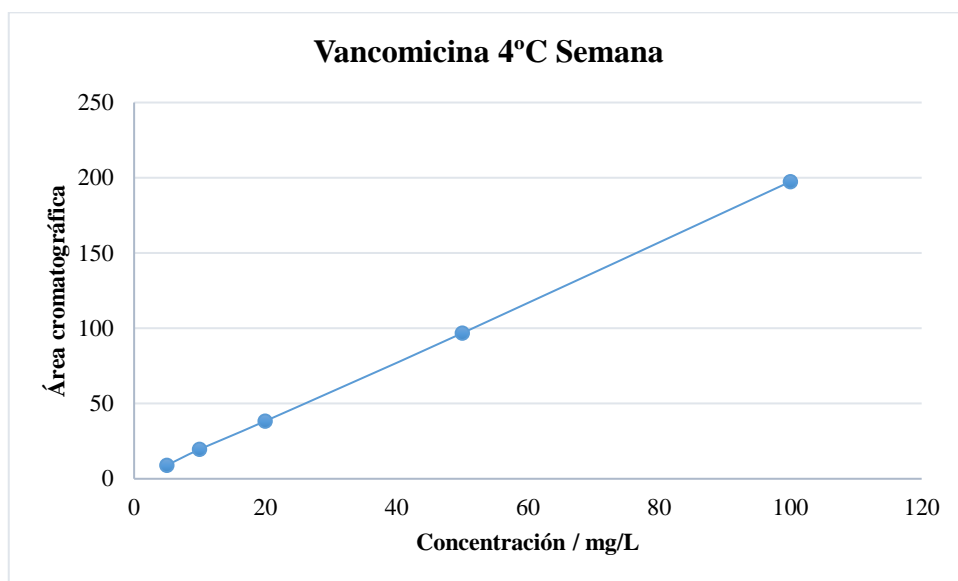
A continuación, en la tabla 13 se muestran las áreas de los patrones de vancomicina almacenados a 4°C, durante una semana, en cada uno de los cromatogramas obtenidos.

**Tabla 13.** Valores de áreas cromatográficas y concentración de patrones.

Patrones / mg/L	Área cromatográfica
5	9,0173
10	19,5842
20	38,3766
50	96,7871
100	197,4421

Una vez se obtienen las áreas de cada uno de los patrones, se representa gráficamente el área cromatográfica de cada patrón frente a su concentración, obteniendo la recta de calibrado, correspondiente a la gráfica 3, con un coeficiente de correlación lineal de  $R^2$ : 0,9999.

**Grafica 3.** Recta de calibrado de vancomicina almacenada a 4°C durante una semana.



En el anexo se muestran las tablas con los cálculos para obtener los parámetros analíticos más destacados, y empleando las Ecuaciones 1 y 2, se calcula la pendiente,  $b$ , y la ordenada en el origen,  $a$ , respectivamente, de la recta de calibrado:

$$b = 1,98$$

$$a = - 1,0$$

La ecuación para la recta de regresión es  $y = 1,98x - 1,0$

Mediante los datos recogidos en las tablas del anexo, y utilizando las ecuaciones correspondientes se calculan los parámetros analíticos recogidos en la tabla 14.

**Tabla 14.** Valores de los parámetros analíticos obtenidos de la recta de calibrado 3.

Parámetro analítico	Valor/ Unidades
$S_{y/x}$	0,9
$S_B$	0,011
$S_a$	0,6
LOD	2 mg/L
LOQ	8 mg/L

El intervalo de confianza al 95 % de la pendiente y de la ordenada en el origen, de la recta de calibrado 3 se calcula aplicando la ecuación 6:

$$b = 1,98 \pm 0,04$$

$$a = - 1,0 \pm 1,8$$

donde  $t(3;0,05 p) = 3,18$ .

Intervalo de confianza del LOD y del LOQ:

$$\text{LOD} = 2 \pm 3$$

$$\text{LOQ} = 8 \pm 3$$

donde  $t(3;0,05 p) = 3,18$ .

Los intervalos de confianza calculados para la recta de calibrado de vancomicina almacenada durante un día a 4°C no son significativamente diferentes, para un intervalo de confianza del 95 %, a los resultados de la recta de vancomicina almacenada a 4°C, durante una semana. Estos resultados permiten concluir que no ha habido degradación del antibiótico vancomicina con el paso del tiempo a una temperatura de 4°C.

#### **Recta de calibrado 4. (Almacenamiento a 37°C una semana)**

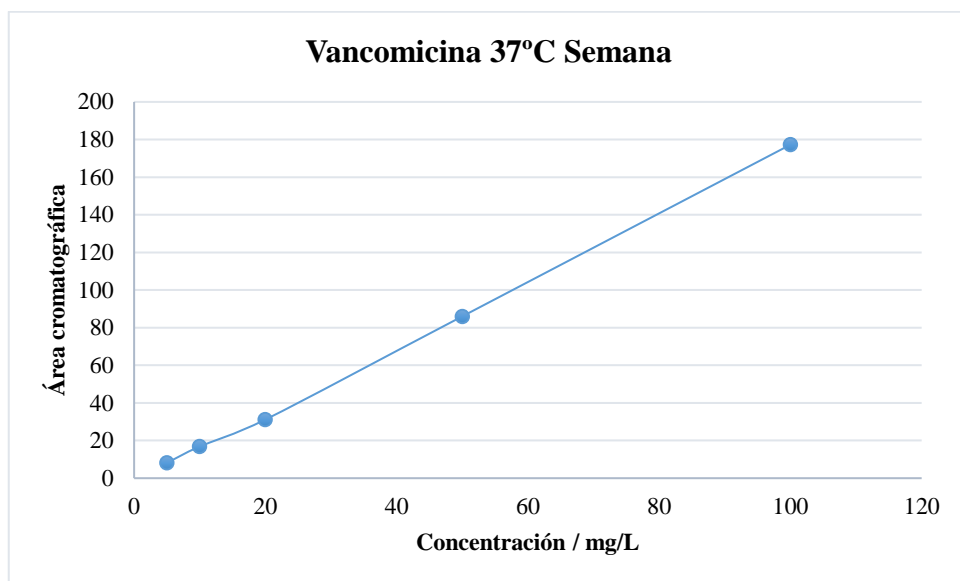
A continuación, en la tabla 15 se muestran las áreas de los patrones de vancomicina almacenados a 37°C, durante una semana, en cada uno de los cromatogramas obtenidos.

**Tabla 15.** Valores de áreas cromatográficas y concentración de patrones.

Patrón / mg/L	Área cromatográfica
5	8,1627
10	16,8482
20	31,1598
50	86,0085
100	177,2543

Una vez se obtienen las áreas de cada uno de los patrones, se representa gráficamente el área cromatográfica de cada patrón frente a su concentración, obteniendo la recta de calibrado, correspondiente a la gráfica 4, con un coeficiente de correlación lineal de  $R^2$ : 0,9994.

**Grafica 4.** Recta de calibrado de vancomicina almacenada a 37°C durante una semana.



En el anexo se muestran las tablas con los cálculos para obtener los parámetros analíticos más destacados, y empleando las Ecuaciones 1 y 2, se calcula la pendiente,  $b$ , y la ordenada en el origen,  $a$ , respectivamente, de la recta de calibrado:

$$b = 1,79$$

$$a = - 2$$

La ecuación para la recta de regresión es  $y = 1,79x - 2$

Con los datos recogidos en las tablas del anexo, y utilizando las ecuaciones correspondientes se calculan los parámetros analíticos recogidos en la tabla 16.

**Tabla 16.** Valores de los parámetros analíticos obtenidos de la recta de calibrado 4.

Parámetro analítico	Valor / Unidades
$S_{y/x}$	1,9
$S_B$	0,02
$S_a$	1,2
LOD	4 mg/L
LOQ	17 mg/L

El intervalo de confianza al 95 % de la pendiente y de la ordenada en el origen, de la recta de calibrado 4 se calcula aplicando la ecuación 6:

$$b = 1,79 \pm 0,08$$

$$a = - 2 \pm 4$$



donde  $t(3;0,05 p) = 3,18$ .

Intervalo de confianza del LOD y del LOQ:

$$\text{LOD} = 4 \pm 6$$

$$\text{LOQ} = 17 \pm 6$$

donde  $t(3;0,05 p) = 3,18$ .

Tanto los intervalos de confianza de la pendiente y la ordenada en el origen, como los límites de detección y cuantificación de la recta de calibrado de vancomicina almacenada a 37°C durante una semana no difieren significativamente de los obtenidos en la recta de vancomicina a 37°C durante un día, para un intervalo de confianza del 95 %. Los valores de LOD y LOQ en la recta de calibrado almacenada durante una semana son más altos que los de la recta de calibrado almacenada durante un día. Por lo tanto, no sería conveniente almacenar el antibiótico a 37°C durante más de una semana, ya que puede producirse degradación del antibiótico vancomicina con el paso del tiempo.

#### **Recta de calibrado 5. (Baja concentración y almacenamiento a 4°C un día)**

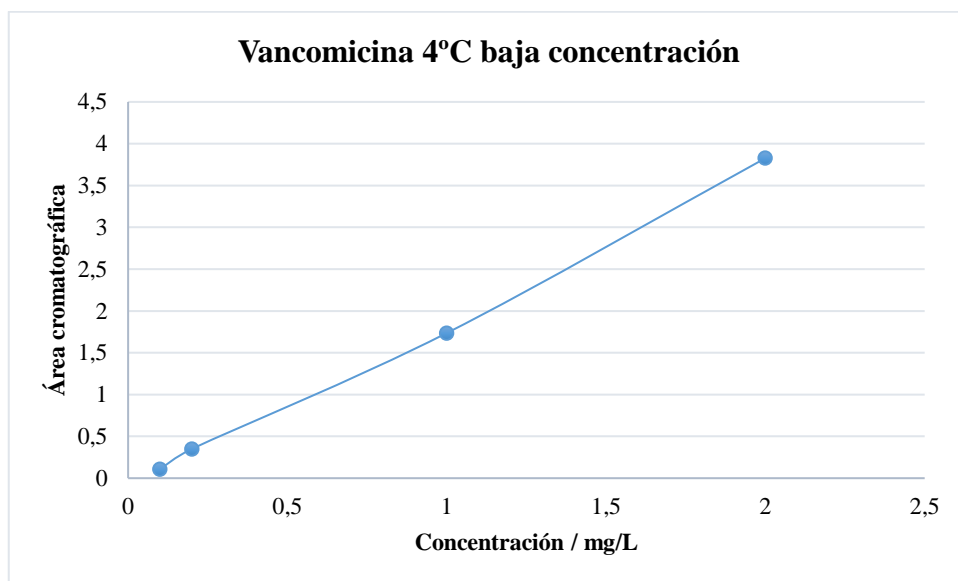
A continuación, en la tabla 17 se muestran las áreas en cada uno de los cromatogramas obtenidos para cada patrón de baja concentración de vancomicina almacenado a 4°C durante un día.

**Tabla 17.** Valores de áreas cromatográficas y concentración de patrones.

Patrón / mg/L	Área cromatográfica
0,1	0,1069
0,2	0,3500
0,5	1,1171
1	1,7359
2	3,8270

Una vez se obtienen las áreas de cada uno de los patrones, se representa gráficamente el área cromatográfica de cada patrón frente a su concentración, obteniendo la recta de calibrado, correspondiente a la gráfica 5. Se ha eliminado el patrón de 0,5 mg/L, mejorando la linealidad de la recta, con un coeficiente de correlación lineal de  $R^2$ : 0,9981.

**Grafica 5.** Recta de calibrado de baja concentración de vancomicina a 4°C un día.



En el anexo se muestran las tablas con los cálculos para obtener los parámetros analíticos más destacados, y empleando las Ecuaciones 1 y 2, se calcula la pendiente,  $b$ , y la ordenada en el origen,  $a$ , respectivamente, de la recta de calibrado:

$$b = 1,9$$

$$a = -0,1$$

La ecuación para la recta de regresión es  $y = 1,9x - 0,09$

Mediante los datos recogidos en las tablas del anexo, y utilizando las ecuaciones correspondientes se calculan los parámetros analíticos recogidos en la tabla 18.

**Tabla 18.** Valores de los parámetros analíticos obtenidos de la recta de calibrado 5.

Parámetro analítico	Valor / Unidades
$S_{y/x}$	0,11
$S_B$	0,07
$S_a$	0,08
LOD	0,2 mg/L
LOQ	1,0 mg/L

El intervalo de confianza al 95 % de la pendiente y de la ordenada en el origen, de la recta de calibrado 5 se calcula aplicando la ecuación 6:

$$b = 1,9 \pm 0,3$$

$$a = -0,1 \pm 0,4$$

donde  $t(2;0,05 p) = 4,30$ .

Intervalo de confianza del LOD y del LOQ:

$$\text{LOD} = 0,2 \pm 0,5$$

$$\text{LOQ} = 1,0 \pm 0,5$$

donde  $t(2;0,05 p) = 4,30$ .

#### **Recta de calibrado 6. (Baja concentración y almacenamiento a 37°C un día)**

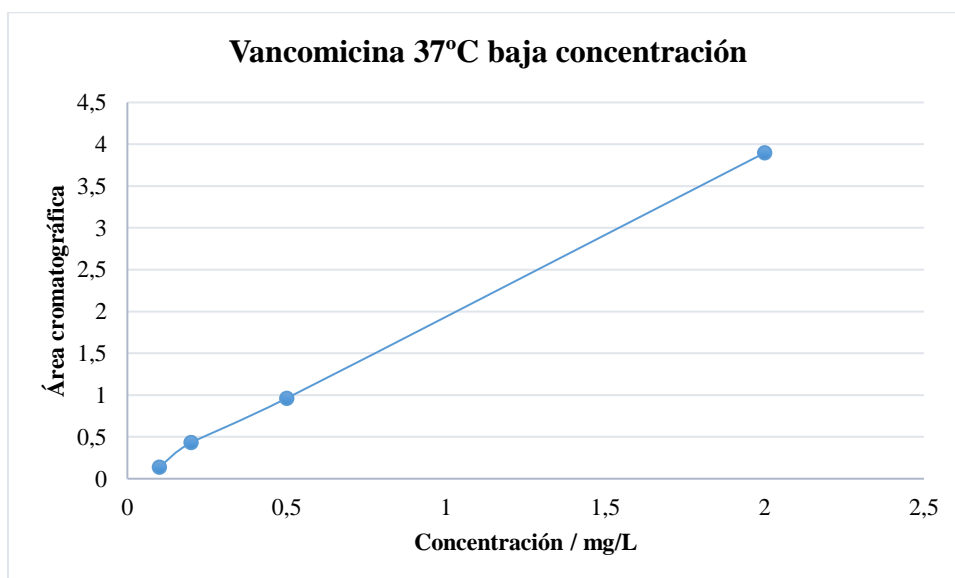
A continuación, en la tabla 19 se muestran las áreas en cada uno de los cromatogramas obtenidos para cada patrón de baja concentración de vancomicina almacenado a 37°C durante un día.

**Tabla 19.** Valores de áreas cromatográficas y concentración de patrones.

Patrón / mg/L	Área cromatográfica
0,1	0,1382
0,2	0,4315
0,5	0,9625
1	1,7791
2	3,8966

Una vez se obtienen las áreas de cada uno de los patrones, se representa gráficamente el área cromatográfica de cada patrón frente a su concentración, obteniendo la recta de calibrado, correspondiente a la gráfica 6. Se ha eliminado el patrón de 1 mg/L, mejorando la linealidad de la recta, con un coeficiente de correlación lineal de  $R^2: 0,9995$ .

**Grafica 6.** Recta de calibrado de baja concentración de vancomicina a 37°C un día.



En el anexo se muestran las tablas con los cálculos para obtener los parámetros analíticos más destacados, y empleando las Ecuaciones 1 y 2, se calcula la pendiente, b, y la ordenada en el origen, a, respectivamente, de la recta de calibrado:

$$b = 1,95$$

$$a = - 0,011$$

La ecuación para la recta de regresión es  **$y = 1,95x - 0,011$**

Mediante los datos recogidos en las tablas del anexo, y utilizando las ecuaciones correspondientes se calculan los parámetros analíticos recogidos en la tabla 20.

**Tabla 20.** Valores de los parámetros analíticos obtenidos de la recta de calibrado 6.

Parámetro analítico	Valor / Unidades
$S_{y/x}$	0,05
$S_B$	0,03
$S_a$	0,03
LOD	0,1 mg/L
LOQ	0,5 mg/L

El intervalo de confianza al 95 % de la pendiente y de la ordenada en el origen, de la recta de calibrado 6 se calcula aplicando la ecuación 6:

$$b = 1,95 \pm 0,14$$

$$a = - 0,01 \pm 0,14$$

donde  $t(2;0,05 p) = 4,30$ .

Intervalo de confianza del LOD y del LOQ:

$$\text{LOD} = 0,1 \pm 0,2$$

$$\text{LOQ} = 0,5 \pm 0,2$$

donde  $t(2;0,05 p) = 4,30$ .

Las rectas calibrado de vancomicina a baja concentración se prepararon para estudiar los límites de detección y cuantificación del método. Comparando los valores de LOD y LOQ en las dos rectas de vancomicina a 4°C y 37°C, almacenada durante un día, se concluye con los resultados no son significativamente diferentes, para un intervalo de confianza del 95 %, aunque en la recta de vancomicina almacenada a 37°C durante un día, se obtienen valores de LOD y LOQ más bajos que en la recta almacenada a 4°C.

## 4.2 Rectas de calibrado de gentamicina

### Recta de calibrado 7. ( $\lambda = 254,4 \text{ nm}$ )

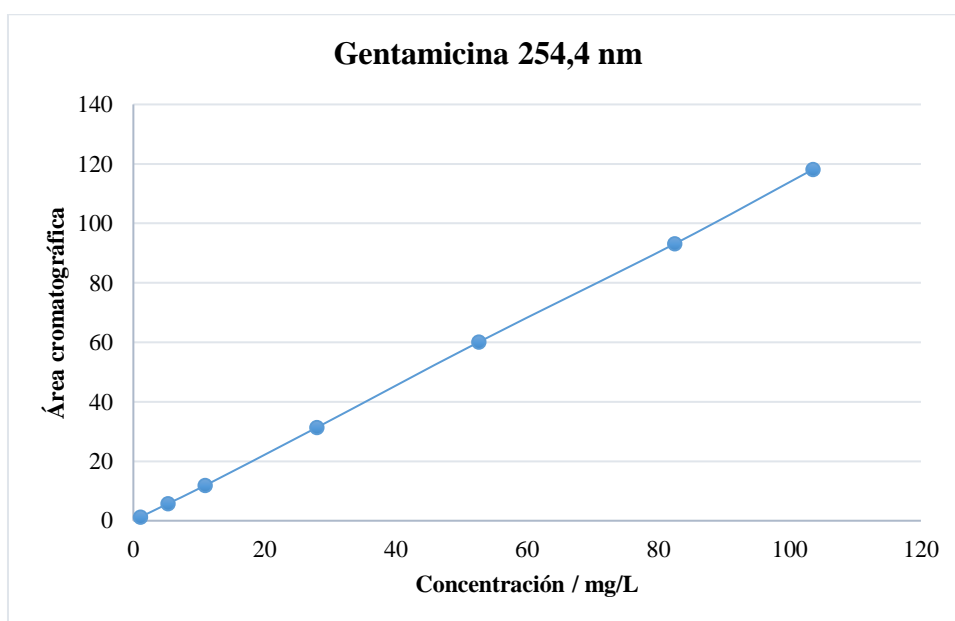
A continuación, en la tabla 21 se muestran las áreas en cada uno de los cromatogramas obtenidos para cada patrón de gentamicina, almacenados a 4°C y detectados a una longitud de onda de 254,4 nm.

**Tabla 21.** Valores de áreas cromatográficas y concentración de patrones.

Patrón / mg/L	Área cromatográfica
1,0866	1,2521
5,284	5,7666
10,94	11,8524
27,9679	31,3645
52,6507	60,1067
82,4886	93,1221
103,5373	118,1268

Una vez se obtienen las áreas de cada uno de los patrones, se representa gráficamente el área cromatográfica de cada patrón frente a su concentración, obteniendo la recta de calibrado, correspondiente a la gráfica 7, con un coeficiente de correlación lineal de  $R^2$ : 0,9999.

**Grafica 7.** Recta de calibrado de gentamicina medida a 254,4 nm.



En el anexo se muestran las tablas con los cálculos para obtener los parámetros analíticos más destacados, y empleando las Ecuaciones 1 y 2, se calcula la pendiente, b, y la ordenada en el origen, a, respectivamente, de la recta de calibrado:

$$b = 1,140$$

$$a = - 0,3$$

La ecuación para la recta de regresión es  **$y = 1,140x - 0,3$**

Con los datos recogidos en las tablas del anexo, y utilizando las ecuaciones correspondientes se calculan los parámetros analíticos recogidos en la tabla 22.

**Tabla 22.** Valores de los parámetros analíticos obtenidos de la recta de calibrado 7.

Parámetro analítico	Valor / Unidades
$S_{y/x}$	0,4
$S_B$	0,004
$S_a$	0,2
LOD	1,0 mg/L
LOQ	4 mg/L

El intervalo de confianza al 95 % de la pendiente y de la ordenada en el origen, de la recta de calibrado 7 se calcula aplicando la ecuación 6:

$$b = 1,140 \pm 0,011$$

$$a = - 0,3 \pm 0,6$$

donde  $t(5;0,05 p) = 2,57$ .

Intervalo de confianza del LOD y del LOQ:

$$\text{LOD} = 1,0 \pm 1,1$$

$$\text{LOQ} = 4,0 \pm 1,1$$

donde  $t(5;0,05 p) = 2,57$ .

#### **Recta de calibrado 8. ( $\lambda = 280,4 \text{ nm}$ )**

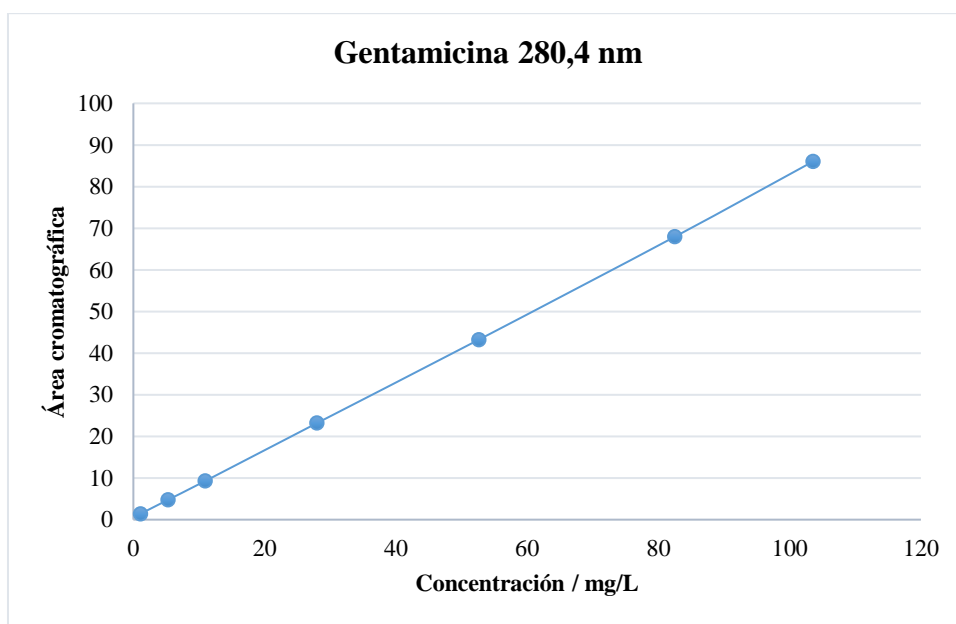
A continuación, en la tabla 23 se muestran las áreas en cada uno de los cromatogramas obtenidos para cada patrón de gentamicina, almacenados a 4°C y detectados a una longitud de onda de 280,4 nm.

**Tabla 23.** Valores de áreas cromatográficas y concentración de patrones.

Patrón / mg/L	Área cromatográfica
1,0866	1,4022
5,284	4,7666
10,94	9,2695
27,9679	23,1871
52,6507	43,2449
82,4886	67,9475
103,5373	86,0105

Una vez se obtienen las áreas de cada uno de los patrones, se representa gráficamente el área cromatográfica de cada patrón frente a su concentración, obteniendo la recta de calibrado, correspondiente a la gráfica 8, con un coeficiente de correlación lineal de  $R^2:0,9999$ .

**Grafica 8.** Recta de calibrado de gentamicina medida a 280,4 nm.



En el anexo se muestran las tablas con los cálculos para obtener los parámetros analíticos más destacados, y empleando las Ecuaciones 1 y 2, se calcula la pendiente,  $b$ , y la ordenada en el origen,  $a$ , respectivamente, de la recta de calibrado:

$$b = 0,824$$

$$a = 0,3$$

La ecuación para la recta de regresión es  $y = 0,824x + 0,3$

Con los datos recogidos en las tablas del anexo, y utilizando las ecuaciones correspondientes se calculan los parámetros analíticos recogidos en la tabla 24.

**Tabla 24.** Valores de los parámetros analíticos obtenidos de la recta de calibrado 8.

Parámetro analítico	Valor / Unidades
$S_{y/x}$	0,3
$S_B$	0,003
$S_a$	0,18
LOD	1,2 mg/L
LOQ	3,5 mg/L

El intervalo de confianza al 95 % de la pendiente y de la ordenada en el origen, de la recta de calibrado 8 se calcula aplicando la ecuación 6:

$$b = 0,824 \pm 0,008$$

$$a = 0,3 \pm 0,5$$

donde  $t(5;0,05 p) = 2,57$ .

Intervalo de confianza del LOD y del LOQ:

$$\text{LOD} = 1,2 \pm 0,8$$

$$\text{LOQ} = 3,5 \pm 0,8$$

donde  $t(5;0,05 p) = 2,57$ .

Para el antibiótico gentamicina, se preparó una recta de calibrado, y se midió a dos longitudes de onda características, 254,4 y 280,4 nm. Los resultados de intervalos de confianza de pendiente, ordenada en el origen y LOD y LOQ para la recta de calibrado de gentamicina a 254,4 nm no difieren significativamente, para un intervalo de confianza del 95 %, de los resultados de la recta de gentamicina medida a 280,4 nm. El detector empleado, DAD, permite medir a varias longitudes de onda y así obtener valores de LOD y LOQ más bajos. En el caso de la gentamicina, la sensibilidad es más alta a 254,4 nm, ya que el área cromatográfica para los patrones es mayor que a 280,4 nm. Por lo tanto, la longitud de onda empleada para la detección de gentamicina en muestras reales de cemento es 254,4 nm.



### 4.3 Cinética de liberación de antibióticos en muestras de cemento

Las muestras de cemento con antibiótico se sumergieron en un volumen de 10 mL de disolución fisiológica salina 0,9%, y se incubaron a una temperatura constante de 37°C sin agitación. A intervalos de tiempo designados (1, 2, 14, 24, 96, 288 horas) se recogió el extractante y se reemplazó por disolución fisiológica nueva, almacenando el extractante en congelador. A continuación, se analizaron mediante la técnica HPLC, obteniendo los cromatogramas correspondientes para cada una de las muestras de cemento preparadas.

Después de varios ensayos, se llegó a la conclusión de que las muestras de aproximadamente 1 gramo de cemento con antibiótico obtenido por el procedimiento antes mencionado, que es el que se aplica de forma real en los hospitales, no son homogéneas. Por ello se prepararon 10 muestras de cada antibiótico para obtener la media de los resultados.

A los resultados obtenidos se le aplicó el contraste de Grubbs, para datos anómalos, que compara la desviación entre los valores anómalos y la media muestral, con la desviación estándar de la muestra. Para calcular el valor estadístico de G se aplica la ecuación 10<sup>30</sup>.

$$G = \frac{|valor\ sospechoso - \bar{x}|}{s} \text{ (Ecuación 10)}$$

donde  $\bar{x}$  es la media muestral y  $s$  la desviación estándar de la muestra, calculada incluyendo el valor sospechoso. Una vez obtenido el valor de G calculado, si este valor supera al valor crítico, el valor sospechoso se rechaza.

Para cada valor de concentración obtenido interpolando en la recta de calibrado se calcula la desviación estándar, mediante la ecuación 11<sup>30</sup>.

$$s = \sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 / (n - 1)} \text{ (Ecuación 11)}$$

donde  $n$  es el número de medidas,  $\bar{x}$  es la media muestral y  $x_i$  es cada uno de los valores de la muestra.

Para cada valor de concentración, los límites de confianza se expresan mediante la ecuación 12<sup>30</sup>.

$$\bar{x} \pm t_{n-1} \cdot s / \sqrt{n} \text{ (Ecuación 12)}$$

donde  $s$  es la desviación estándar,  $n$  es el tamaño o número de muestras, y  $t_{n-1}$  es un valor tabulado que depende del número de grados de libertad y del intervalo de confianza.

#### 4.3.1 Gentamicina

- **Cemento Palamed®G**

Se prepararon 10 muestras de cemento Palamed®G que contiene gentamicina, para estudiar la liberación del antibiótico con el paso del tiempo, en contacto con el líquido extractante. Los resultados se recogen en la tabla 25.

**Tabla 25.** Valores de área total por gramo de muestra para gentamicina a cada tiempo.

Muestra	Área 1h	Área 2h	Área 14h	Área 1d	Área 4d	Área 12d
1	1,1131	1,4026	5,2748	5,5463	9,1196	9,7203
2	0,9391	1,4360	3,8613	5,2316	6,5215	6,9571
3	1,9347	2,8858	7,6861	9,2250	11,0229	11,6004
4	0,7240	0,9224	4,7217	6,4051	7,6976	8,3571
5	1,7163	2,4790	11,3641	14,1006	17,2611	17,8699
6	0,3887	1,0234	6,2880	7,3406	8,6311	9,1751
7	1,2737	1,7059	4,8416	5,8824	7,0433	7,9641
8	1,8038	2,4775	7,4994	9,4379	11,0002	14,0705
9	2,1751	2,7419	5,2875	6,1983	7,6271	7,9496
10	1,4849	2,3019	5,1000	6,7789	8,0039	8,6136

En la tabla anterior se recoge el número muestra y el área total por gramo de muestra. sumando las áreas de los tiempos anteriores. Estos valores de las áreas totales para cada tiempo se interpolaron en la recta de calibrado 7, correspondiente a gentamicina, obteniendo los valores de concentración de gentamicina para cada una de las muestras. Los resultados se recogen en la tabla 26.

**Tabla 26.** Concentración de gentamicina en cemento Palamed®G a cada tiempo.

	1h	2h	14h	1d	4d	12d
Muestra	Conc / mg / L	Conc / mg / L	Conc / mg / L	Conc / mg / L	Conc / mg / L	Conc / mg / L
1	1,2490	1,5029	4,8989	5,1371	8,2709	8,7978
2	1,0964	1,5322	3,6593	4,8611	5,9923	6,3743
3	1,9696	2,8037	7,0137	8,3634	9,9402	10,4467
4	0,9078	1,0818	4,4139	5,8902	7,0239	7,6022
5	1,7780	2,4470	10,2394*	12,6395*	15,4113*	15,9452
6	0,6137	1,1704	5,7875	6,7107	7,8425	8,3197
7	1,3898	1,7689	4,5190	5,4318	6,4499	7,2576
8	1,8548	2,4456	6,8500	8,5501	9,9203	12,6131
9	2,1804	2,6775	4,9100	5,7088	6,9620	7,2448
10	1,5751	2,2916	4,7456	6,2180	7,2924	7,8272

A continuación, se aplica el contraste G a los valores de concentración, para un intervalo de confianza del 95 %, mediante la ecuación 10, rechazando los valores anómalos, indicados con un asterisco en la tabla anterior, y calculando el valor medio de la concentración para 1, 2, 14, 24, 96 y 288 horas.

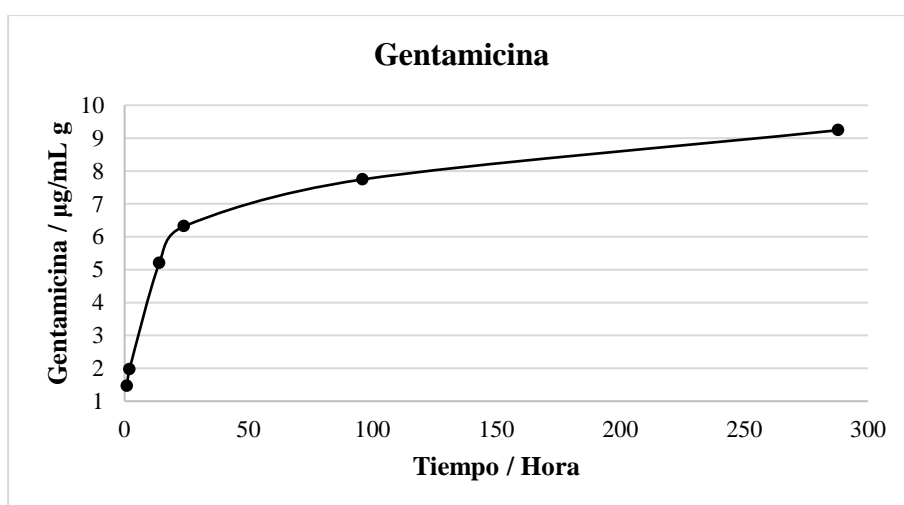
Los valores de concentración de gentamicina a cada tiempo se muestran en la tabla 27.

**Tabla 27.** Valores medios de concentración total y s de gentamicina (mg/L) a cada hora.

Concentración / mg/L	s	Tiempo / Hora
1,5	0,5	1
2,0	0,6	2
5,2	1,1	14
6,3	1,3	24
7,7	1,4	96
9	3	288

Representando gráficamente la concentración de gentamicina frente al tiempo se obtiene la gráfica 8.

**Grafica 9.** Liberación de gentamicina en cemento Palamed®G.



En la gráfica se observa que la mayor liberación de gentamicina tiene lugar en las primeras horas, debido a un proceso de liberación superficial del antibiótico. Después la liberación de gentamicina se mantiene constante hasta un total de 9 mg/L.

- **Cemento Palamed®G+V**

Se prepararon 10 muestras de cemento Palamed®G+V, que contiene gentamicina y vancomicina. Los resultados obtenidos para gentamicina se muestran en la tabla 28.

**Tabla 28.** Valores de área total por gramo de muestra para gentamicina a cada tiempo.

Muestra	Área 1h	Área 2h	Área 14h	Área 1d	Área 4d	Área 12d
1	-	-	4,8175	5,4509	6,2470	7,0460
2	-	-	3,2772	4,7522	6,0790	7,8697
3	-	0,9526	9,1833	12,0505	16,0095	17,9056
4	-	1,3230	9,5915	11,1658	15,3179	16,9472
5	4,3140	4,8260	15,9737	19,8808	23,2236	25,5392
6	1,0203	1,5849	8,8120	10,9387	14,6117	16,6699
7	0,8602	1,8477	9,6856	13,1684	16,8543	-
8	1,7264	2,4377	9,7362	11,6554	13,6019	19,4146
9	2,1062	3,0207	11,5509	14,1563	16,4342	18,6472
10	-	0,8979	7,5976	10,5087	12,5879	17,6280

En la anterior tabla se muestran las áreas totales por gramo de muestra para cada tiempo designado, obtenidas sumando las áreas de los tiempos anteriores. Hay que destacar que, en algunas muestras, el antibiótico gentamicina no se libera en las primeras horas. Estos valores de áreas se interpolan en la recta de calibrado 7, de gentamicina, obteniendo los valores de concentración para cada muestra. Estos resultados se recogen en la tabla 29.

**Tabla 29.** Concentración de gentamicina en cemento Palamed®G+V a cada tiempo.

	1h	2h	14h	1d	4d	12d
Muestra	Conc / mg/L	Conc / mg/L	Conc / mg/L	Conc / mg/L	Conc / mg/L	Conc / mg/L
1	-	-	4,4979	5,0534	5,7516	6,4524
2	-	-	3,1470	4,4406	5,6043	7,1748
3	-	1,1082	8,3268	10,8414	14,3136	15,9766
4	-	1,4331	8,6849	10,0655	13,7070	15,1360
5	4,0563	4,5053	14,2822	17,7089	20,6406	22,6715
6	1,1676	1,6628	8,0012	9,8663	13,0877	14,8928
7	1,0272	1,8932	8,7674	11,8219	15,0545	-
8	1,7868	2,4107	8,8117	10,4949	12,2021	17,3000
9	2,1200	2,9220	10,4033	12,6883	14,6860	16,6269
10	-	1,0602	6,9361	9,4893	11,3127	15,7331

Se aplica el contraste G a los valores de área de gentamicina, mediante la ecuación 10, con un intervalo de confianza del 95 %, y se calcula el valor medio de concentración total a 1, 2, 14, 24, 96 y 288 horas.

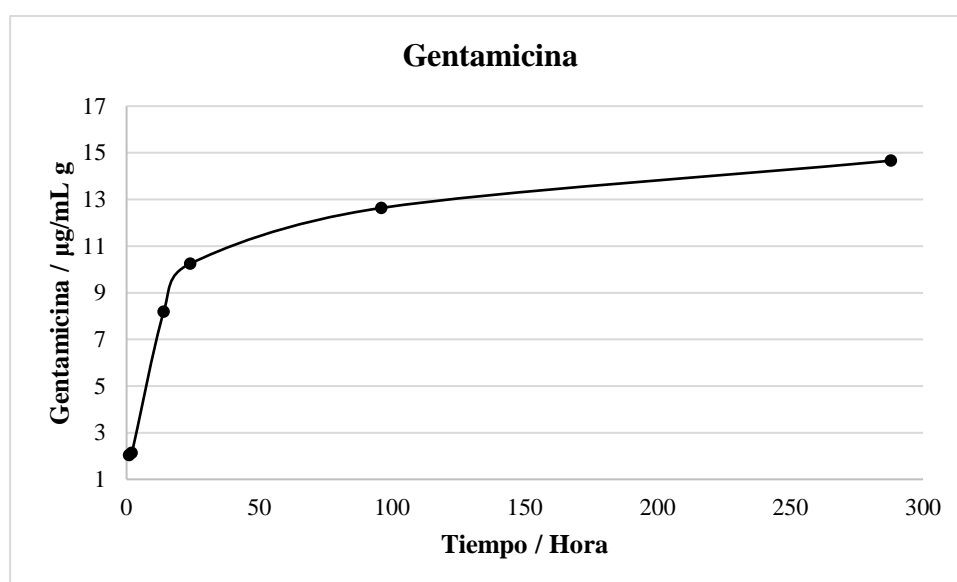
Los resultados de gentamicina en cemento Palamed®G+V se muestran en la tabla 30.

**Tabla 30.** Valores medios de concentración total y s de gentamicina (mg/L) a cada hora.

Concentración / mg/L	s	Tiempo / Hora
2,0	1,2	1
2,1	1,2	2
8	3	14
10	4	24
13	4	96
15	5	288

Una vez obtenidos los valores de concentración de gentamicina, se representan gráficamente frente al tiempo, en horas, obteniendo la gráfica 10.

**Grafica 10.** Liberación de gentamicina en cemento Palamed®G+V.



La liberación de gentamicina en muestras de cemento Palamed®G+V es muy similar a la liberación que tiene lugar en las muestras de cemento Palamed®G, ya que se libera una gran cantidad de antibiótico en las primeras 14 horas, hasta 8 mg/L. La cantidad de antibiótico que se libera inicialmente se debe a un fenómeno de liberación superficial. La cantidad de gentamicina liberada en presencia del antibiótico vancomicina es mayor que en las muestras de cemento sin vancomicina, liberándose un total de 15 mg/L de gentamicina.

### 4.3.2 Vancomicina

- **Cemento Palamed®G+V**

Para el análisis de vancomicina en muestras de cemento se prepararon un total de 10 muestras de cemento Palamed®G+V, que contiene vancomicina y gentamicina. Los resultados para vancomicina se recogen en la tabla 31.

**Tabla 31.** Área total de vancomicina por gramo de muestra en cemento Palamed®G+V.

Muestra	Área 1h	Área 2h	Área 14h	Área 1d	Área 4d	Área 12d
1	218,6734	242,0504	285,2264	287,9583	313,9617	335,5774
2	-	31,6674	83,8635	92,4395	127,1350	167,4894
3	168,3543	215,6350	310,0976	328,3999	369,8395	403,3020
4	143,7575	181,2146	242,4951	248,9278	290,4589	312,5565
5	108,3580	152,5452	276,6533	303,0070	378,7821	437,5969
6	188,9848	227,5431	339,9309	356,9674	401,3454	425,4583
7	110,5010	143,5314	217,8206	242,8440	281,0388	-
8	150,1690	189,0695	288,8087	304,9453	357,6455	403,5397
9	173,3660	200,5071	308,3871	324,2502	361,6309	427,1384
10	115,9263	145,2724	230,2213	247,6437	286,0682	336,6017

La tabla 31 recoge el área cromatográfica total por gramo de muestra para cada tiempo, obtenidas sumando las áreas de los tiempos anteriores. Cabe destacar que en una de las muestras no se detecta vancomicina en la primera hora. Estos valores de áreas totales se interpolan en la recta de calibrado de vancomicina, obteniendo los valores de concentración total para cada muestra. Estos resultados se recogen en la tabla 32.

**Tabla 32.** Concentración total de vancomicina en cemento Palamed®G+V a cada tiempo.

	1h	2h	14h	1d	4d	12d
Muestra	Conc / mg/L	Conc / mg/L	Conc / mg/L	Conc / mg/L	Conc / mg/L	Conc / mg/L
1	113,0446	125,1016	147,3705	148,7795	162,1912	173,3399
2	-	16,5928*	43,5139*	47,9371*	65,8320*	86,6455*
3	87,0916	111,4775	160,1983	169,6380	191,0112	208,2701
4	74,4053	93,7245	125,3310	128,6488	150,0692	161,4665
5	56,1474	78,9377	142,9487	156,5411	195,6235	225,9583
6	97,7321	117,6193	175,5853	184,3722	207,2609	219,6976
7	57,2527	74,2887	112,6047	125,5110	145,2107	-
8	77,7122	97,7758	149,2181	157,5408	184,7219	208,3927
9	89,6764	103,6750	159,3160	167,4977	186,7775	220,5642
10	60,0509	75,1867	119,0006	127,9865	147,8046	173,8682

A estos resultados, se aplica el contraste G para un intervalo de confianza del 95 %, aplicando la ecuación 10, para rechazar los posibles resultados anómalos, indicados con un asterisco en la tabla anterior, y calcular el valor medio de concentración a 1, 2, 14, 24, 96 y 288 horas.

Los valores de concentración obtenidos para cada tiempo de vancomicina se muestran en la tabla 33.

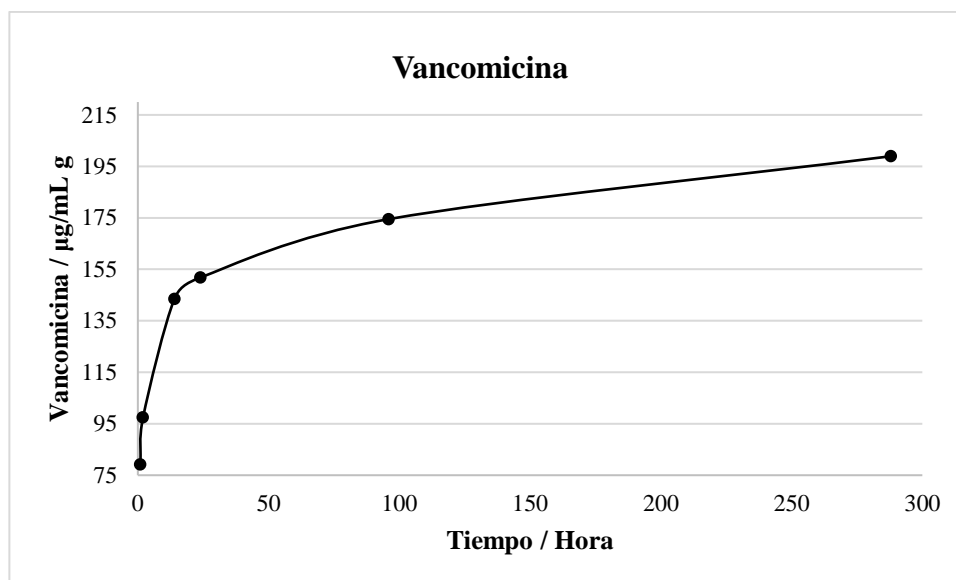
**Tabla 33.** Valores medios de concentración total y s de vancomicina (mg/L) a cada hora.

Concentración / mg/L	s	Tiempo / Hora
$8 \times 10^1$	$2 \times 10^1$	1
$10 \times 10^1$	$3 \times 10^1$	2
$14 \times 10^1$	$4 \times 10^1$	14
$15 \times 10^1$	$4 \times 10^1$	24
$17 \times 10^1$	$4 \times 10^1$	96
$20 \times 10^1$	$4 \times 10^1$	288



Representando gráficamente la concentración de vancomicina frente al tiempo, en horas, se obtiene la gráfica 11.

**Grafica 11.** Liberación de vancomicina en cemento Palamed®G+V.



La grafica de liberación de vancomicina es muy similar a las gráficas de liberación de gentamicina anteriormente comentadas, debido a que la cantidad de antibiótico que se libera inicialmente es debida a un proceso de liberación superficial. La cantidad de vancomicina que se libera es mucho mayor que la cantidad de gentamicina liberada en las mismas muestras de cemento Palamed®G+V, debido a que este cemento contiene 2,0 g de vancomicina y 0,5 g de gentamicina. En las primeras 14 horas se libera una gran cantidad de antibiótico, hasta  $14 \times 10^1$  mg/L. A partir del primer día, la liberación de vancomicina se mantiene más o menos constante, liberándose un total de  $20 \times 10^1$  mg/L.

#### 4.4 Muestras de cemento

El estudio cinético de liberación de gentamicina y vancomicina se ha realizado sumando los valores de las áreas obtenidos de los cromatogramas a cada tiempo. Sin embargo, es interesante conocer la cantidad de antibiótico que ha liberado en cada fracción de tiempo. Para ello no se suman las áreas de los tiempos anteriores, y así se calcula la concentración de antibiótico liberada a cada tiempo específico.

#### 4.4.1 Gentamicina

- **Cemento Palamed®G**

Los valores obtenidos de las áreas cromatográficas para cada tiempo se interpolan en la recta de calibrado correspondiente a gentamicina, obteniendo los valores de concentración de gentamicina para cada muestra a cada tiempo, los cuales se recogen en la tabla 34.

**Tabla 34.** Valores de concentración de gentamicina para cada hora.

	1h	2h	14h	1d	4d	12d
Muestra	Conc / mg/L	Conc / mg/L	Conc / mg/L	Conc / mg/L	Conc / mg/L	Conc / mg/L
1	1,2490	0,5267	3,6688	0,5109	3,4066	0,7997
2	1,0964	0,7086	2,3998	1,4746	1,4040	0,6548
3	1,9696	1,1069	4,4828	1,6224	1,8497	0,7792
4	0,9078	0,4468	3,6049	1,7491	1,4064	0,8511
5	1,7780	0,9417	8,0653*	2,6728*	3,0446*	0,8067
6	0,6137	0,8294	4,8899	1,1960	1,4046	0,7499
7	1,3898	0,6519	3,0229	1,1855	1,2909	1,0804
8	1,8548	0,8636	4,6771	1,9729	1,6430	2,9656
9	2,1804	0,7699	2,5053	1,0716	1,5259	0,5556
10	1,5751	0,9893	2,7268	1,7452	1,3472	0,8076

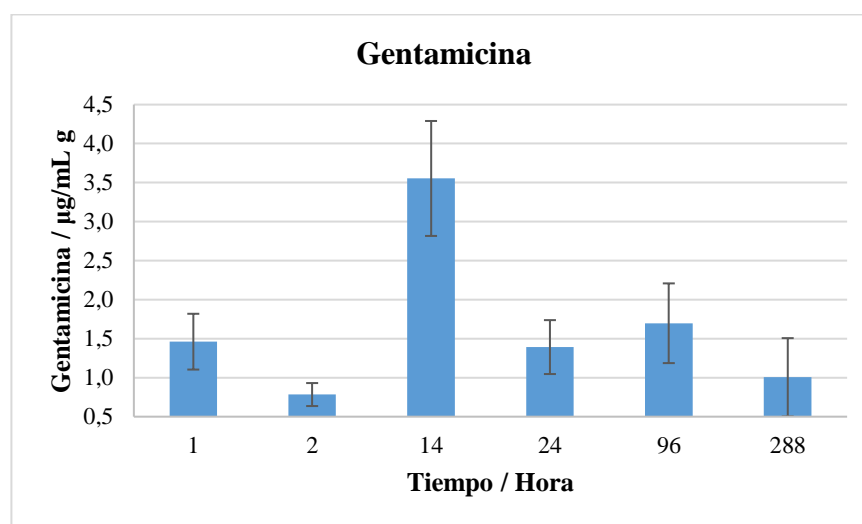
Al igual que en el tratamiento de datos realizado anteriormente, se aplica el contraste G a los valores de concentración de gentamicina, mediante la ecuación 10, con un intervalo de confianza del 95 %, y se rechazan los valores anómalos, indicados con un asterisco en la tabla, para calcular el valor medio de concentración a cada tiempo. Se calcula la desviación estándar para cada concentración, mediante la ecuación 11, y los límites de confianza, mediante la ecuación 12. La concentración de gentamicina en cemento Palamed®G a cada tiempo se muestran en la tabla 35.

**Tabla 35.** Valores de concentración y s de gentamicina (mg/L) a cada hora.

Concentración / mg/L	s	Tiempo / Hora
1,5	0,5	1
0,8	0,2	2
3,6	1,0	14
1,4	0,4	24
1,7	0,7	96
1,0	0,7	288

Representando gráficamente la concentración de gentamicina frente al tiempo se obtiene la gráfica de columnas 12. El límite de confianza calculado para cada valor de concentración de gentamicina se indica en cada columna de la gráfica, mediante las barras de error.

**Grafica 12.** Concentración de gentamicina liberada a cada tiempo en cemento Palamed®G.



En la gráfica anterior se observa que la mayor liberación de gentamicina se produce entre las 2 y las 14 horas, y coincide con el tramo en el que se produce mayor dispersión de resultados entre muestras. La cantidad total que se libera es de 9,9 mg/L por gramo de cemento, y la recuperación de gentamicina obtenida es:

$$9,9 \frac{\text{mg gentamicina}}{\text{L} \cdot \text{g cemento}} \cdot 0,01 \text{ L} \cdot 62,9 \text{ g cemento} = 6,2 \text{ mg gentamicina}$$

$$\text{Recuperación (\%)} = \frac{6,2 \text{ mg gentamicina}}{550 \text{ mg genta cemento}} \cdot 100 = 1,1 \%$$

- **Cemento Palamed®G+V**

Los valores obtenidos de las áreas cromatográficas para cada tiempo se interpolan en la recta de calibrado correspondiente a gentamicina, obteniendo los valores de concentración de gentamicina para cada muestra a cada tiempo, los cuales se recogen en la tabla 36.

**Tabla 36.** Valores de concentración de gentamicina para cada hora.

	1h	2h	14h	1d	4d	12d
Muestra	Conc / mg/L	Conc / mg/L	Conc / mg/L	Conc / mg/L	Conc / mg/L	Conc / mg/L
1	-	-	4,4979	0,8283	0,9710	0,9735
2	-	-	3,1470	1,5664	1,4364	1,8433
3	-	1,1082	7,4914	2,7874	3,7450	1,9357
4	-	1,4331	7,5245	1,6534	3,9143	1,7017
5	4,0563	0,7219	10,0496	3,6994	3,2045	2,3037
6	1,1676	0,7679	6,6112	2,1379	3,4942	2,0778
7	1,0272	1,1388	7,1469	3,3273	3,5054	-
8	1,7868	0,8967	6,6737	1,9560	1,9799	5,3706
9	2,1200	1,0748	7,7540	2,5578	2,2705	2,2137
10	-	1,0602	6,1487	2,8259	2,0962	4,6932

Se aplica el contraste G a los valores de concentración de gentamicina, mediante la ecuación 10, con un intervalo de confianza del 95 %, para calcular el valor medio de concentración a cada tiempo. También se calcula la desviación estándar para cada concentración, mediante la ecuación 11, y los límites de confianza, mediante la ecuación 12.

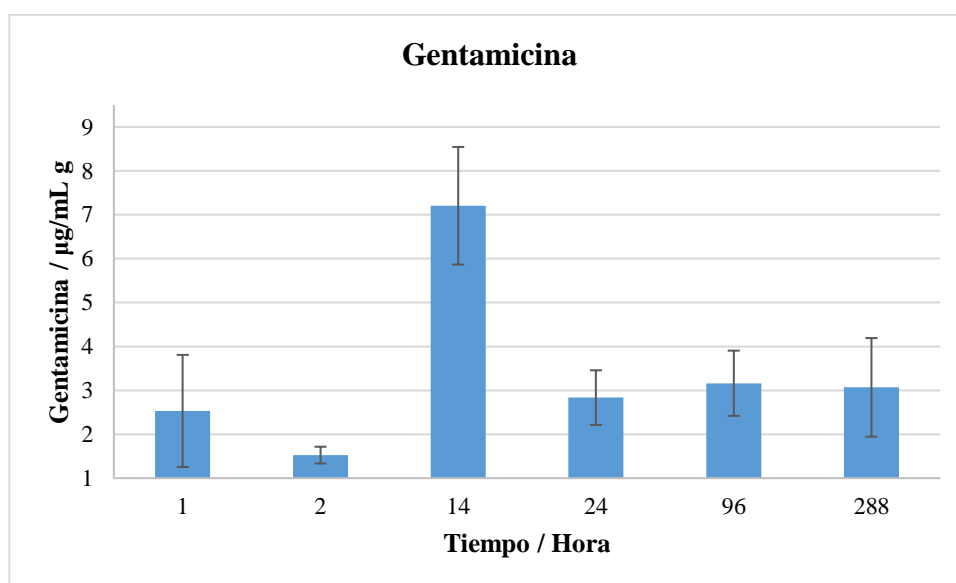
La concentración de gentamicina en cemento Palamed®G+V a cada tiempo se muestran en la tabla 37.

**Tabla 37.** Valores de concentración y s de gentamicina (mg/L) a cada hora.

Concentración / mg/L	s	Tiempo / Hora
2,0	1,2	1
1,0	0,2	2
6,7	1,9	14
2,3	0,9	24
2,7	1,0	96
2,6	1,5	288

Representando gráficamente la concentración de gentamicina frente al tiempo se obtiene la gráfica de columnas 13. El límite de confianza calculado para cada valor de concentración de gentamicina se indica en cada columna de la gráfica.

**Gráfica 13.** Concentración de gentamicina liberada a cada tiempo en cemento Palamed®G+V.



En la gráfica se observa que la mayor liberación de gentamicina se produce en la primera hora, y a las 14 horas, coincidiendo con los tramos de mayor dispersión de resultados entre muestras. En comparación con la liberación de gentamicina del cemento Palamed®G, se recupera el doble de antibiótico. Por lo tanto, se produce mayor liberación de gentamicina en las muestras de cemento Palamed®G+V en presencia de vancomicina, que en las muestras de cemento que contienen solamente gentamicina. La cantidad total que se libera es de 17,3 mg/L por gramo de cemento, y la recuperación de gentamicina obtenida es:

$$17,3 \frac{\text{mg gentamicina}}{\text{L} \cdot \text{g cemento}} \cdot 0,01 \text{ L} \cdot 62,9 \text{ g cemento} = 10,9 \text{ mg gentamicina}$$

$$\text{Recuperación (\%)} = \frac{10,9 \text{ mg gentamicina}}{500 \text{ mg genta cemento}} \cdot 100 = 2,2 \%$$

#### 4.4.2 Vancomicina

- **Cemento Palamed®G+V**

Los valores obtenidos de las áreas cromatográficas para cada tiempo se interpolan en la recta de calibrado correspondiente a vancomicina, obteniendo los valores de concentración de vancomicina para cada muestra a cada tiempo, los cuales se recogen en la tabla 38.

**Tabla 38.** Valores de concentración de vancomicina para cada hora.

	1h	2h	14h	1d	4d	12d
Muestra	Conc / mg/L	Conc / mg/L	Conc / mg/L	Conc / mg/L	Conc / mg/L	Conc / mg/L
1	113,0446	12,3169	22,5286	1,6688	13,6715	11,4085
2	-	16,5928	27,1809	4,6830	18,1546	21,0733
3	87,0916	24,6457	48,9806	9,6995	21,6330	17,5187
4	74,4053	19,5790	31,8663	3,5776	21,6802	11,6570
5	56,1474	23,0501	64,2708	13,8522	39,3421*	30,5946
6	97,7321	20,1470	58,2258	9,0467	23,1485	12,6965
7	57,2527	17,2958	38,5758	13,1661	19,9595	-
8	77,7122	20,3234	51,7021	8,5825	27,4409	23,9306
9	89,6764	14,2583	55,9008	8,4415	19,5396	34,0465
10	60,0509	15,3956	44,0737	9,2457	20,0779	26,3234

Se aplica el contraste G a los valores de concentración de vancomicina, mediante la ecuación 10, con un intervalo de confianza del 95 %, y se rechazan los valores anómalos, indicados con un asterisco en la tabla, para calcular el valor medio de concentración a cada tiempo. Se calcula la desviación estándar para cada concentración, mediante la ecuación 11, y los límites de confianza, mediante la ecuación 12.

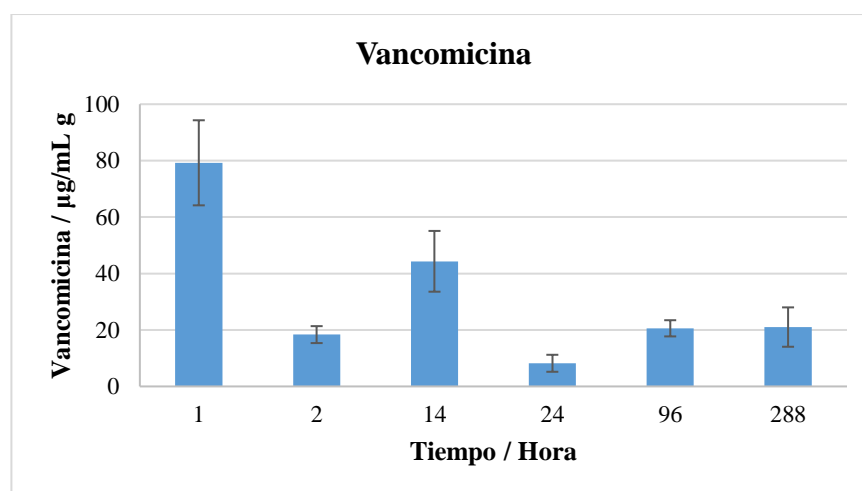
La concentración de vancomicina en cemento Palamed®G+V a cada tiempo se muestran en la tabla 39.

**Tabla 39.** Valores de concentración y s de vancomicina (mg/L) a cada hora.

Concentración / mg/L	s	Tiempo / Hora
79	20	1
18	4	2
44	15	14
8	4	24
21	4	96
21	8	288

Representando gráficamente la concentración de vancomicina frente al tiempo se obtiene la gráfica de columnas 14. El límite de confianza calculado para cada valor de concentración de vancomicina se indica en cada columna de la gráfica.

**Grafica 14.** Concentración de vancomicina liberada a cada tiempo en cemento Palamed®G+V.



En la gráfica se observa que la mayor cantidad de vancomicina se libera en la primera hora. Además, la mayor dispersión de resultados entre muestras coincide con el tiempo de mayor liberación de vancomicina, en la primera hora. La cantidad total que se libera es de 191,7 mg/L por gramo de cemento, y la recuperación de vancomicina obtenida es:

$$191,7 \frac{\text{mg vancomicina}}{\text{L} \cdot \text{g cemento}} \cdot 0,01 \text{ L} \cdot 62,9 \text{ g cemento} = 120,6 \text{ mg vancomicina}$$

$$\text{Recuperación (\%)} = \frac{86,1 \text{ mg vancomicina}}{2000 \text{ mg vanco cemento}} \cdot 100 = 6,0 \%$$

## 5. CONCLUSIÓN

1. Los resultados obtenidos de las muestras de cemento permiten demostrar que la muestra no es homogénea, y la etapa de mezclado y el sistema a vacío no son adecuados. En este trabajo se han simulado las condiciones de preparación del cemento llevadas a cabo en un hospital, y basándose en los resultados, se concluye que no hay seguridad de la cantidad de antibiótico que contiene el cemento aplicado en la zona de intervención, debido a que el contenido de antibiótico en el cemento no es homogéneo.

2. Se ha realizado un estudio de vancomicina a distintas temperaturas de almacenamiento, que permiten concluir que no ha habido degradación de vancomicina en los primeros días de almacenamiento, y, por lo tanto, la temperatura de almacenamiento no es una variable a tener en cuenta. Tampoco ha habido degradación de vancomicina con el paso del tiempo. En el estudio de gentamicina a diferentes longitudes de onda, la sensibilidad es más alta a 254,4 nm que a 280,4 nm.

3. Los resultados obtenidos demuestran que la liberación de vancomicina se produce antes que la liberación de gentamicina, en la primera hora, proporcionando una gran cantidad de antibiótico en la zona de interés. Además, la presencia de vancomicina aumenta la liberación de gentamicina en las muestras que combinan ambos antibióticos, obteniendo valores más altos de recuperación.

4. Los valores de recuperación de gentamicina y vancomicina son bajos, similares a los valores de recuperación obtenidos en la bibliografía.<sup>19</sup>



## 6.REFERENCIAS

- (1) Buchholz, H. J. *Bone Jt. Surg. - Ser. B* **1981**, 63 (3), 342–353.
- (2) Van De Belt, H.; Neut, D.; Uges, D. R. A.; Schenk, W.; Van Horn, J. R.; Van Der Mei, H. C.; Busscher, H. J. *Biomaterials* **2000**, 21 (19), 1981–1987.
- (3) Miola, M.; Bistolfi, A.; Valsania, M. C.; Bianco, C.; Fucale, G.; Verné, E. *Mater. Sci. Eng. C* **2013**, 33 (5), 3025–3032.
- (4) Pithankuakul, K.; Samranvedhya, W.; Visutipol, B.; Rojviroj, S. *J. Arthroplasty* **2015**, 30 (5), 858–863.
- (5) Klekamp, J.; Dawson, J. M.; Haas, D. W.; DeBoer, D.; Christie, M. J. *Arthroplasty* **1999**, 14 (3), 339–346.
- (6) Chang, Y. H.; Tai, C. L.; Hsu, H. Y.; Hsieh, P. H.; Lee, M. S.; Ueng, S. W. N. *Bone Joint Res.* **2014**, 3 (8), 246–251.
- (7) Paz, E.; Sanz-Ruiz, P.; Abenojar, J.; Vaquero-Martín, J.; Forriol, F.; Del Real, J. C. *J. Arthroplasty* **2015**, 30 (8), 1423–1429.
- (8) Sanz-Ruiz, P.; Paz Jimenez, E.; Del Real Romero, J.; Abenojar, J.; Vaquero Martin, J.; Forriol, F. *Trauma(Spain)* **2012**, 23 (1), 59–63.
- (9) Sanz-Ruiz, P.; Paz, E.; Abenojar, J.; del Real, J. C.; Forriol, F.; Vaquero, J. *Rev. Esp. Cir. Ortop. Traumatol.* **2014**, 58 (1), 3–10.
- (10) Bistolfi, A.; Massazza, G.; Verné, E.; Massè, A.; Deledda, D.; Ferraris, S.; Miola, M.; Galetto, F.; Crova, M. *ISRN Orthop.* **2011**, 2011, 1–8.
- (11) De Santis, R.; Mollica, F.; Ambrosio, L.; Nicolais, L.; Ronca, D. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2003**, 14 (7), 583–594.
- (12) Valle, A. G. Della; Bostrom, M.; Brause, B.; Harney, C.; Salvati, E. A. *Acta Orthop. Scand.* **2001**, 72 (3), 237–240.
- (13) Phillips, H.; Boothe, D. M.; Shofer, F.; Davidson, J. S.; Bennett, R. A. *Vet. Surg.* **2007**, 36 (3), 272–278.
- (14) Penner, M. J.; Masri, B. A.; Duncan, C. P. *J. Arthroplasty* **1996**, 11 (8), 939–944.
- (15) Anagnostakos, K.; Kelm, J. J. *Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **2009**, 90 B (1), 467–475.
- (16) Nelson, C. L.; Griffin, F. M.; Harrison, B. H.; Cooper, R. E. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **1992**, No. 284, 303–309.
- (17) Macaulay, W.; DiGiovanni, C. W.; Restrepo, A.; Saleh, K. J.; Walsh, H.; Crossett, L. S.; Peterson, M. G. E.; Li, S.; Salvati, E. A. *J. Arthroplasty* **2002**, 17 (5), 569–575.

- (18) Brock, H. S.; Moodie, P. G.; Hendricks, K. J.; McIff, T. E. *J. Arthroplasty* **2010**, 25 (6), 990–997.
- (19) Anagnostakos, K.; Kelm, J.; Regitz, T.; Schmitt, E.; Jung, W. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **2005**, 72 (2), 373–378.
- (20) Cerretani, D.; Giorgi, G.; Fornara, P.; Bocchi, L.; Neri, L.; Ceffa, R.; Ghisellini, F.; Ritter, M. a. *J. Arthroplasty* **2002**, 17 (5), 619–626.
- (21) Kokubo, T.; Takadama, H. *Biomaterials* **2006**, 27 (15), 2907–2915.
- (22) Jesús Valle, M. J. de; López, F. G.; Navarro, A. S. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, 48 (3), 835–839.
- (23) Kratzer, A.; Liebchen, U.; Schleibinger, M.; Kees, M. G.; Kees, F. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2014**, 961, 97–102.
- (24) Ye, G.; Cai, X.; Wang, B.; Zhou, Z.; Yu, X.; Wang, W.; Zhang, J.; Wang, Y.; Dong, J.; Jiang, Y. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, 48 (3), 860–865.
- (25) Abu-Shandi, K. H. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, 395 (2), 527–532.
- (26) Laki, M.; Ludanyi, K.; Hajdu, M.; Klebovich, I.; Antal, I.; Zahar, A.; Szendroi, M. *J. Chromatogr. Sci.* **2011**, 49 (3), 177–181.
- (27) Webb, J. C.; Gbejuade, H.; Lovering, A.; Spencer, R. *Int. Orthop.* **2013**, 37 (10), 2031–2036.
- (28) Lemos Azi, M.; Kfuri Junior, M.; Martinez, R.; Jansen, A. *Acta Ortop Bras* **2010**, 18 (1), 31–34.
- (29) Penner, M. J.; Duncan, C. P.; Masri, B. A. *J. Arthroplasty* **1999**, 14 (2), 209–214.
- (30) Miller, J. N.; Miller, J. C. *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*, 4<sup>a</sup> edición.; Prentice Hall, 2002.
- (31) Skoog, D. A.; West, D. W.; Holler, F. J. *Fundamentos de Química Analítica*, 4<sup>a</sup> Edición.; Editorial Reverté.

7. ANEXO. Tablas de cálculos desarrollados para los parámetros analíticos en las rectas de calibrado.

Recta de calibrado 1. Vancomicina

	$x_i$	$y_i$	$(x_i - \bar{x})$	$(x_i - \bar{x})^2$	$(y_i - \bar{y})$	$(y_i - \bar{y})^2$	$(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})$
	5	9.4162	-32	1024	-63.19006	3992.98368	2022.08192
	10	20.1014	-27	729	-52.50486	2756.76032	1417.63122
	20	39.6452	-17	289	-32.96106	1086.43148	560.33802
	50	97.7999	13	169	25.19364	634.719496	327.51732
	100	196.0686	63	3969	123.46234	15242.9494	7778.12742
<b>Suma</b>	<b>185</b>	<b>363.0313</b>	<b>0</b>	<b>6180</b>	<b>0</b>	<b>23713.8444</b>	<b>12105.6959</b>

	$x_i$	$x_i^2$	$y_i$	$\hat{y}_i$	$ y_i - \hat{y}_i $	$(y_i - \hat{y}_i)^2$
	5	25	9.4162	9.92304498	0.50684498	0.25689184
	10	100	20.1014	19.7172973	0.38410267	0.14753486
	20	400	39.6452	39.305802	0.33939798	0.11519099
	50	2500	97.7999	98.0713161	0.2714161	0.0736667
	100	10000	196.0686	196.01384	0.05476044	0.00299871
<b>Suma</b>		<b>13025</b>				<b>0.59628309</b>

## Recta de calibrado 2. Vancomicina

	$x_i$	$y_i$	$(x_i - \bar{x})$	$(x_i - \bar{x})^2$	$(y_i - \bar{y})$	$(y_i - \bar{y})^2$	$(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$
	5	9.2481	-32	1024	-61.98586	3842.24684	1983.54752
	10	19.1187	-27	729	-52.11526	2716.000325	1407.11202
	20	38.199	-17	289	-33.03496	1091.308582	561.59432
	50	96.0279	13	169	24.79394	614.7394607	322.32122
	100	193.5761	63	3969	122.34214	14967.59922	7707.55482
<b>Suma</b>	<b>185</b>	<b>356.1698</b>	<b>0</b>	<b>6180</b>	<b>0</b>	<b>23231.89443</b>	<b>11982.1299</b>

	$x_i$	$x_i^2$	$y_i$	$\hat{y}_i$	$ y_i - \hat{y}_i $	$(y_i - \hat{y}_i)^2$
	5	25	9.2481	9.190568932	0.057531068	0.003309824
	10	100	19.1187	18.88484879	0.233851214	0.05468639
	20	400	38.199	38.2734085	0.074408495	0.005536624
	50	2500	96.0279	96.43908762	0.411187621	0.16907526
	100	10000	193.5761	193.3818862	0.194213835	0.037719014
<b>Suma</b>		<b>13025</b>				<b>0.270327112</b>

### Recta de calibrado 3. Vancomicina

	$x_i$	$y_i$	$(x_i - \bar{x})$	$(x_i - \bar{x})^2$	$(y_i - \bar{y})$	$(y_i - \bar{y})^2$	$(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})$
	5	9.0173	-32	1024	-63.22416	3997.29441	2023.17312
	10	19.5842	-27	729	-52.65726	2772.78703	1421.74602
	20	38.3766	-17	289	-33.86486	1146.82874	575.70262
	50	96.7871	13	169	24.54564	602.488443	319.09332
	100	197.4421	63	3969	125.20064	15675.2003	7887.64032
<b>Suma</b>	<b>185</b>	<b>361.2073</b>	<b>0</b>	<b>6180</b>	<b>0</b>	<b>24194.5989</b>	<b>12227.3554</b>

	$x_i$	$x_i^2$	$y_i$	$\hat{y}_i$	$ y_i - \hat{y}_i $	$(y_i - \hat{y}_i)^2$
	5	25	9.0173	8.92829288	0.08900712	0.007922267
	10	100	19.5842	18.82097524	0.763224757	0.58251203
	20	400	38.3766	38.60633997	0.229739968	0.052780453
	50	2500	96.7871	97.96243414	1.175334142	1.381410346
	100	10000	197.4421	196.8892578	0.552842233	0.305634535
<b>Suma</b>		<b>13025</b>				<b>2.330259631</b>

Recta de calibrado 4. Vancomicina

	$x_i$	$y_i$	$(x_i - \bar{x})$	$(x_i - \bar{x})^2$	$(y_i - \bar{y})$	$(y_i - \bar{y})^2$	$(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})$
	5	8.1627	-32	1024	-55.724	3105.164176	1783.168
	10	16.8482	-27	729	-47.0385	2212.620482	1270.0395
	20	31.1598	-17	289	-32.7269	1071.049984	556.3573
	50	86.0085	13	169	22.1218	489.3740352	287.5834
	100	177.2543	63	3969	113.3676	12852.21273	7142.1588
<b>Suma</b>	<b>185</b>	<b>319.4335</b>	<b>0</b>	<b>6180</b>	<b>0</b>	<b>19730.42141</b>	<b>11039.307</b>

	$x_i$	$x_i^2$	$y_i$	$\hat{y}_i$	$ y_i - \hat{y}_i $	$(y_i - \hat{y}_i)^2$
	5	25	8.1627	6.725239806	1.437460194	2.06629181
	10	100	16.8482	15.65671796	1.191482039	1.419629449
	20	400	31.1598	33.51967427	2.359874272	5.569006579
	50	2500	86.0085	87.1085432	1.100043204	1.21009505
	100	10000	177.2543	176.4233248	0.830975243	0.690519854
<b>Suma</b>		<b>13025</b>				<b>10.95554274</b>

Recta de calibrado 5. Vancomicina

	$x_i$	$y_i$	$(x_i - \bar{x})$	$(x_i - \bar{x})^2$	$(y_i - \bar{y})$	$(y_i - \bar{y})^2$	$(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})$
	0.1	0.1069	-0.66	0.4356	-1.32048	1.74366743	0.8715168
	0.2	0.35	-0.56	0.3136	-1.07738	1.16074766	0.6033328
	0.5	1.1171	-0.26	0.0676	-0.31028	0.09627368	0.0806728
	1	1.7359	0.24	0.0576	0.30852	0.09518459	0.0740448
	2	3.827	1.24	1.5376	2.39962	5.75817614	2.9755288
<b>Suma</b>	<b>3.8</b>	<b>7.1369</b>	<b>0</b>	<b>2.412</b>	<b>0</b>	<b>8.85404951</b>	<b>4.605096</b>

	$x_i$	$x_i^2$	$y_i$	$\hat{y}_i$	$ y_i - \hat{y}_i $	$(y_i - \hat{y}_i)^2$
	0.1	0.01	0.1069	0.167279104	0.060379104	0.003645636
	0.2	0.04	0.35	0.358203483	0.008203483	0.000067297
	0.5	0.25	1.1171	0.930976617	0.186123383	0.034641914
	1	1	1.7359	1.885598507	0.149698507	0.022409643
	2	4	3.827	3.794842289	0.032157711	0.001034118
<b>Suma</b>		<b>5.3</b>				<b>0.061798609</b>

Recta de calibrado 6. Vancomicina

	$x_i$	$y_i$	$(x_i - \bar{x})$	$(x_i - \bar{x})^2$	$(y_i - \bar{y})$	$(y_i - \bar{y})^2$	$(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})$
	0.1	0.1382	-0.66	0.4356	-1.30338	1.698799424	0.8602308
	0.2	0.4315	-0.56	0.3136	-1.01008	1.020261606	0.5656448
	0.5	0.9625	-0.26	0.0676	-0.47908	0.229517646	0.1245608
	1	1.7791	0.24	0.0576	0.33752	0.11391975	0.0810048
	2	3.8966	1.24	1.5376	2.45502	6.0271232	3.0442248
<b>Suma</b>	<b>3.8</b>	<b>7.2079</b>	<b>0</b>	<b>2.412</b>	<b>0</b>	<b>9.089621628</b>	<b>4.675666</b>

	$x_i$	$x_i^2$	$y_i$	$\hat{y}_i$	$ y_i - \hat{y}_i $	$(y_i - \hat{y}_i)^2$
	0.1	0.01	0.1382	0.162168905	0.023968905	0.000574508
	0.2	0.04	0.4315	0.356019071	0.075480929	0.005697371
	0.5	0.25	0.9625	0.937569569	0.024930431	0.000621526
	1	1	1.7791	1.906820398	0.127720398	0.0163125
	2	4	3.8966	3.845322056	0.051277944	0.002629428
<b>Suma</b>		<b>5,3</b>			<b>.</b>	<b>0.025835333</b>



# Recta de calibrado 7. Gentamicina

	$x_i$	$y_i$	$(x_i - \bar{x})$	$(x_i - \bar{x})^2$	$(y_i - \bar{y})$	$(y_i - \bar{y})^2$	$(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})$
	1.0866	1.2521	-39.47841	1558.5452	-44.689495	1997.15099	1764.27041
	5.284	5.7666	-35.28101	1244.7450	-40.174995	1614.03024	1417.41458
	10.94	11.8524	-29.62501	877.64147	-34.089195	1162.07323	1009.89290
	27.9679	31.3645	-12.59711	158.68729	-14.577095	212.491706	183.629335
	52.6507	60.1066	12.085686	146.06378	14.165038	200.648304	171.194199
	82.4886	93.1221	41.923586	1757.5870	47.180538	2226.00318	1977.97733
	103.537	118.1268	62.972286	3965.5088	72.852050	5210.70379	4545.66734
<b>Suma</b>	<b>283.955</b>	<b>321.5912</b>	<b>0</b>	<b>9708.7835</b>	<b>0</b>	<b>12623.1014</b>	<b>11070.0461</b>

	$x_i$	$x_i^2$	$y_i$	$\hat{y}_i$	$ y_i - \hat{y}_i $	$(y_i - \hat{y}_i)^2$
	1.0866	1.18069956	1.2521	0.9279368	0.3241632	0.10508178
	5.284	27.920656	5.7666	5.713851669	0.052748331	0.002782386
	10.94	119.6836	11.8524	12.16287595	0.310475945	0.096395313
	27.9679	782.2034304	31.3645	31.57824732	0.213747317	0.045687915
	52.6507	2772.09621	60.10663333	59.7218075	0.384825831	0.14809092
	82.4886	6804.36913	93.12213333	93.74326108	0.621127751	0.385799684
	103.5373	10719.97249	118.1268	117.7431863	0.383613652	0.147159434
<b>Suma</b>		<b>21227.42622</b>				<b>0.930997432</b>